

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、ワクチン株であるセービ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中間バルク1件、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、検定方法の開発を引き続きおこなった。しかし当面の間、生ポリオワクチン検定も続くため、従来の生ポリオ検定法の改良に努めている。さらに、小児の下痢症予防のためのロタウイルスワクチン導入への対応が求められており、ロタウイルスの研究基盤の構築を開始する。

わが国の食中毒の多くの原因となっているノロウイルスに関しては、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。ノロウイルスの爆発的な流行は観察されていないが、引き続き警戒が必要である。カリシウイルスに関する基礎研究が進展している。従来から進めている中空粒子を用いた研究に加え、マウスノロウイルスやネコカリシウイルスによる感染増殖モデルを導入し、カリシウイルスの複製増殖に関する理解が進むことが期待される。

第2室はWHO世界ポリオ根絶計画に参画している。WHOの指定をうけて、世界の特殊専門ラボとして、また西太平洋地域の指定ラボとして世界各地で分離さ

れるポリオウイルスの性状解析を続けた。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。JICAとの共催で実施した第19回ポリオ実験室診断技術研修会ではポリオ流行国など各国からの参加者に講義および実習を実施した。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を同定している。PSGL-1に関する解析が進み、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。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およびウイルス因子の両面からの研究が進んだ。新たなモデル系の構築も進んでいる。新規ワクチン開発も進行している。B型肝炎ウイルスの研究の重要性から、新規抗ウイルス薬のスクリーニングを開始した。また、今後重要性が増す抗ウイルス薬に対する薬剤耐性ウイルスへ迅速な対応が必要である。肝炎研究7ヶ年戦略に基づく肝炎ウイルス研究の方向性を定め、研究成果の情報収集・解析、研究者育成のために、肝炎研究基盤整備事業が開始した。今年度は7回の研修会を実施し、肝炎ウイルス研究データベースの構築をおこなった。

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。本年度はA型肝炎ワクチン2件、B型肝炎ワクチン4件の検定をおこなった。B型肝炎ワクチン接種のユニバーサル化に関する議論が研究班や学会を中心にして進んでいる。本格的な議論を進めるために、基盤となるデータの集積が必要である。

A型肝炎報告数は2010年3月以降増加の傾向があ

り、警戒が必要である。我が国における抗体陽性者の高齢化、数年前からの韓国におけるA型肝炎の流行などの要因に注目している。E型肝炎研究はウイルス培養が可能となり、感染性クローンも樹立できた。ウイルス学的な研究が進展している。

以下のような国際的技術協力をおこなった。

Park YoungBin (大韓民国、ソウル大学) <平成21年度食品の安心・安全確保推進研究推進事業 外国人研究者招へい事業による研究協力> 平成22年2月3日～平成22年2月16日、平成18年度から21年度にかけて韓国で流行したノロウイルスの分子疫学的解析と、ノロウイルス流行株の抗原性変化の研究のためのウイルス様中空粒子の作出。

方 苓 (中国、広東省疾病予防控制中心) <笹川フェロー> 平成21年9月10日～平成22年8月26日、E型肝炎ウイルスの分子ウイルス学とワクチン研究。

宋 士利 (中国、杭州市余杭区疾病対策センター) 平成21年7月20日～平成21年10月20日、E型肝炎ウイルスの検査技術の習得。

王 澤璽 (中国、武漢生物製品研究所) 平成21年7月20日～平成21年10月20日、E型肝炎ウイルス様粒子の作製技術習得。

今年度末までのウイルス第二部に人事異動について記載する。平成20年10月に政木隆博主任研究官が就任、平成21年3月末に村上恭子主任研究官が退官、平成21年4月に片山和彦第一室長が就任した。平成21年12月に渡士幸一主任研究員が就任、平成22年3月末に宇田川悦子主任研究官と鈴木哲朗室長が退官された。退官された村上氏、宇田川氏、鈴木氏の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、新職員の皆さんの活躍に大いに期待する。

ハンスマン・グラント研究員は、2008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に長期出張中であり、2010年中に帰国予定。

業 績

調査・研究

I. 下痢症ウイルスに関する研究

1. ノロウイルス (NoV) に関する研究

(1) ノロウイルスリバーシジェネティックシステム
のノロウイルスプロテアーゼを利用した制御

新生ウイルス粒子を産生可能なヒトノロウイルス GII/3 U201 株の完全長 cDNA pKS-U201F を用いたリバーシジェネティックシステムは、pKS-U201F を導入するとウイルスの複製が始まり、24 時間後には強い細胞毒性を示す。ウイルスの複製を制御するため、protease に含まれる GDCG モチーフを GDGG に変換し、protease の活性を失わせた cDNA クローン pKS-U201FproM、活性のある protease 領域のみを組み込んだ pKS-Pro を構築した。細胞内に pKS-U201FproM を単独で導入すると細胞毒性を示さないが、その後、pKS-Pro 導入すると、protease がトランスに作用し、ウイルス粒子を産生すると共に強い細胞毒性を示すことが明らかとなった。本システムは、トランスで供給するノロウイルス protease により、細胞毒性の発現、ウイルス複製をコントロールできる可能性がある。今後、本システムは、ウイルス複製機構、細胞毒性発現機構、病原性発現機構の解析や、rotease 活性阻害剤のスクリーニングなどに利用可能である。

[片山和彦, 岡智一郎, 脇田隆字]

(2) ノロウイルスを利用した蛍光ワクチン用ベクター
作製の試み

経口ワクチンに特化した腸管特異的な導入が可能なベクターとしてヒトノロウイルスを利用した遺伝子導入ベクターの作製を行った。pKS-U201F の ORF2 領域を EGFP 遺伝子と交換した pKSF-U201F-EGFP、ORF2/3 領域を CAG promoter で強制発現する pCAG-ORF2/3 を COS1 細胞に導入して、EGFP 遺伝子を含む粒子の作製を試みた。細胞より CsCl 浮上密度勾配遠心により、細胞内に存在する新生粒子の分離精製を行ったところ、感染性粒子と同様の密度 1.38 g/cm^3 にノロウイルス様の粒子が存在する事、粒子は U201F-EGFP RNA を内包している事が明らかになった。これらの粒子は、分化誘導依存的に Caco2 細胞に結合することも明らかになった。これらの結果は、DNA 導入をベースにした方法により、ノロウイルスベクター粒子を

作出可能であることを示している。

[中西 章(国立長寿医療研究センター), 片山和彦, 岡智一郎, 脇田隆字]

(3) ノロウイルス(NoV)のゲノム解析

2006年5月～2010年3月の間に全国20カ所の衛生研究所で収集した感染者糞便を用い、計276のNoV遺伝子型GII/4のゲノム全長の塩基配列を得た。少なくとも7種のGII/4の単系統亜株(2004/05, 2006a, 2006b, 2007a, 2007b, 2008a, 2008bと命名)が急性胃腸炎の集団発生に関わっていた。4種は、進化起源の異なる配列が組み合わさって生じたモザイクゲノムをもっていた。4種に共通するゲノム組換え点として、ORF1/ORF2境界の高度保存領域を見いだした。この領域での組換えにより、別個に進化した近縁のノロウイルスの間で、複製関連遺伝子と capsid 遺伝子の変異セットを効率よく交換できる。これにより、複製能と免疫逃避能をバランスよく変化させたウイルスが迅速に発生し、ウイルスの適応変化能力を高めている可能性がある。得られた情報は、ノロウイルスサーベランスに還元した。

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

(4) 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、VLPs を用いた In vitro-binding assay (ELISA, Biacore) によって NoV が ABO 抗原だけでなく Lewis 抗原においてもタイプ 1, 2 構造の識別を行っていることを明らかにした。平成 21 年度は糖鎖遺伝子改変細胞を用いた解析により、細胞上の血液型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を確認した。NoV は血液型抗原のタイプ 1, 2 構造を識別することによって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, 榎谷内晶(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]

(5) 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 $\alpha 1, 2$ Fucosyltransferase (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 Lewis 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 GI/2 株の capsid P ドメインと Le-a 複合体の X 線結晶構造解析を昨年度までに行った。今年度は、Le-a との比較のため、Le-b, Le-x, tetra-A (type 1), tetra-B (type 1), tri-H (type 1) の導入を行い、tetra-B (type 1) を除いて、糖鎖との複合体の構造モデルを得ることに成功した。

[熊谷安希子, 久保田智巳(産総研), 伊藤浩美(産総研), 古川早苗(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]

(6) ノロウイルス 3C 様プロテアーゼの変異導入解析

これまでノロウイルス Chiba407 株 (GI/4) の 3C 様プロテアーゼに種々の変異を導入し、酵素活性に重要なアミノ酸残基の検索を行ってきた。Ala 置換で活性が消失したり、タンパク質発現量が低下したりする Trp6, Trp19, Thr27, Leu86, Leu95, Leu97, Met101, Gln117, Leu121, Thr134, Tyr143, Val144, Val167 の 14 残基についてさらにいくつかの変異を導入して機能への影響を見た。既報の立体構造を考慮すると、Thr134 と Tyr143 が基質認識に重要であると考えられた。また、これら 14 残基の多くは互いに相互作用していることが示唆された。

[染谷雄一]

(7) ノロウイルス様中空粒子の昆虫細胞での自己集合
ノロウイルス Chiba407 株 (GI/4) のキャプシド (VP1) タンパク質を Tn5 細胞で発現させると、通常の 38 nm のウイルス様中空粒子 (VLP) の他に、23 nm の小粒子を形成する。VLP を SDS-PAGE で分離すると、58 kDa と 52 kDa の 2 種のバンドが得られる。アミノ酸配列を解析したところ、58k タンパク質の N 末端は Ala4 残基、52 k タンパク質は Thr45 残基であり、昆虫細胞内で切断を受けていることが示唆された。Leu43-Ala44-Thr45 を Ala-Pro-Val に置換したところ、58 kDa の単一のタンパク質が生成し、VLP のサイズも 38 nm に均一化された。

[染谷雄一, 白土東子]

(8) ノロウイルス様中空粒子の立体構造解析

これまで遺伝子型 GI/1 に属する Norwalk 株の VLP の三次元立体構造が明らかにされている。ノロウイルスは多様な遺伝子型があり、組織血液型抗原結合パターンも多様である。これはウイルス粒子表層の構造が多様であることを示唆する。これを明らかにするために、昆虫細胞で発現させた Chiba407 株 (GI/4) の triple mutant VLP を精製し、結晶化を試みている。

[染谷雄一, 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)]

2. サポウイルス (SaV) に関する研究

(1) サポウイルス遺伝子型タイピング法確立を目的としたサブゲノム遺伝子塩基配列の解析

サポウイルスは遺伝的に極めて多様であるため、系統樹解析や遺伝子型タイピング法の基盤となるレファレンス株の塩基配列の蓄積が急務である。そこでタイピングに有用な構造蛋白質全長領域の塩基配列情報の蓄積を目的として、地方衛生研究所との共同研究によって検出されたサポウイルスのうち、新たな遺伝子型に属する可能性のある 14 株について、開始コドンからゲノム末端までの遺伝子領域 (約 2.3kb) を PCR で増幅し、塩基配列を決定した。

[岡智一郎, 原田誠也 (熊本県保健環境科学研), 飯塚節子 (島根県保健環境科学研), 山下育孝 (愛媛県衛生環境

研), 入谷展弘 (大阪市立環境科学研), 片山和彦]

(2) 環境水からのサポウイルス検出を目的とした新規プライマーの設計

環境水中のサポウイルス核酸検出を行うため、新たに設計したプライマーと既報のプライマーを組み合わせた nested RT-PCR 系を構築した。河川水 60 検体を対象にした結果、従来法のサポウイルス検出率が 2% (1/60) であったのに対し、今回新たに構築した方法は、17% (10/60) とサポウイルスの検出率が大幅に改善された。本法は従来法と比較して環境水からのサポウイルス検出に有用である。今後、本検出系を食用貝からのサポウイルス検出に応用する。

[北島正章 (東大院工学), 岡智一郎, 原本英司 (山梨大工学), 片山浩之 (東大院工学), 片山和彦]

(3) 河川中のサポ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サポ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 および新規に構築した nested RT-PCR 法によりサポウイルス RNA を検出した。河川水中の最大濃度は 1.0×10^3 copies/L であった。nested RT-PCR 法で検出された株は GI/1, GI/2, GI/3, GI/5, GI/unclassified, GII/1, GII/2, GII/3, GV/1 と多様であった。本研究で対象とした多摩川では上流域に比べて中流域および下流域で SaV 遺伝子濃度および陽性率が高かったことから、河川流量に占める下水処理水の割合が高い中流域および下流域では、下水処理水の影響を受けて河川水が SaV に汚染されていると考えられた。また、河川水中の SaV 遺伝子濃度は冬期に上昇する傾向が認められたことから、この流域の SaV 感染者が冬期に増加していた可能性が示された。河川水中の SaV 遺伝子を解析することにより、流域における SaV の流行状況および流行株を網羅的に把握するこ

とが可能になる。

[北島正章 (東大院工学), 岡智一郎, 原本英司 (山梨大工学), 片山浩之 (東大院工学), 片山和彦]

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複製機構の解析

マウスノロウイルス (MuNoV) 感染細胞におけるウイルス複製と、複製した MuNoV 粒子の解析を行い、ヒトノロウイルス (HuNoV) のモデルとしての有用性を探った。MuNoV S7-PP3 株を, RAW264.7 (ATCC TIB-71) 細胞に感染させ, 感染後 30 時間までの細胞における MuNoV 蛋白質の細胞内局在を抗 MuNoV 非構造蛋白質領域抗体, 構造蛋白質領域抗体を用いた免疫蛍光抗体法にて観察した。MuNoV 感染細胞は, 感染後 12 時間から非構造蛋白質及び構造蛋白質が細胞質に観察された。非構造蛋白質の一部と構造蛋白質の細胞内局在は一致していた。感染細胞内における非構造蛋白質の一部 (VPg) と構造蛋白質 (VP1, VP2) の局在は, HuNoV のリバーシジェネティックシステムから得られた知見と類似しており, MuNoV の複製機構は HuNoV のモデルとして有用である。

[片山和彦, 岡智一郎, 高木弘隆 (バイオセーフティ管理室), 遠矢幸伸 (日本大学), 脇田隆字]

(2) マウスノロウイルス感染性粒子の解析

MuNoV の感染性粒子のエクステリアおよびインテリアの構造を明らかにするため, S7-PP3 株を RAW264.7 (ATCC TIB-71) 細胞を用いて増殖させると同時に RNA 又は蛋白質にアイソトープラベルを行った。培養上清に含まれる MuNoV 粒子を CsCl 浮上密度勾配遠心法にて分離精製し, Western Blotting, Northern Blotting にて解析を施行した。

CsCl 浮上密度勾配遠心法の密度 $1.36\text{g}/\text{cm}^3$ のフラクションに含まれるウイルス粒子を各種 MuNoV 抗体で免疫沈降を行った所, 抗 VP1 抗体でのみ免疫沈降可能であった。免疫沈降した粒子は, VP1, VP2 と VPg, 約 7.5 kb の RNA を含んでいることが明らかとなった。粒子内容物の RNase 処理を行わない場合, VPg は複数のバンドとして検出されたが, RNase 処理後は 60 kDa, 20 kDa の 2 本のバ

ンドとして検出された。MuNoV の感染性粒子は, その内部に VP2, VPg, RNA を内包しており, RNA と VPg は強固に結合していることが示唆された。

[片山和彦, 岡智一郎, 高木弘隆 (バイオセーフティ管理室), 遠矢幸伸 (日本大学), 脇田隆字]

(3) マウスノロウイルスのエタノール感受性と粒子, 遺伝子への影響について

マウスノロウイルス (MuNoV) は, ネコカリシウイルス (FCV) と異なりエタノールに対し感受性を示すことが報告されている。しかし, MuNoV の詳細なエタノール感受性は調べられていない。そこで, MuNoV のエタノールに対する感受性を詳細に検討した。MuNoV S7-PP3 株を RAW264.7 (ATCC TIB-71) 細胞で増殖させてストックしエタノール感受性試験に用いた。エタノール 70 及び 80% では 15 秒以内に $4\log_{10}\text{TCID}_{50}$ 以上の感染価減少が認められた。60%では 60 秒以内に, 50%では 120 秒以内にそれぞれ $4\log_{10}\text{TCID}_{50}$ 以上の感染価減少が認められた。FCV と MuNoV には, エタノール感受性に大きな違いがあることが明らかとなった。どの様なメカニズムでエタノール処理により, MuNoV が感染性を失うのかは明らかではないが, エタノール処理が実験動物における MuNoV 汚染除去, 感染防御役立つ可能性がある。

[高木弘隆 (バイオセーフティ管理室), 遠矢幸伸 (日本大学), 片山和彦, 岡智一郎, 杉山和良]

(4) マウスとヒトのノロウイルスの酵素の構造類似性

マウスノロウイルス (MuNoV) とヒトノロウイルス (HuNoV) の基盤情報収集を目的として, 両者のプロテアーゼおよびポリメラーゼの類似性をコンピュータ解析により調べた。HuNoV には U201 株を, MuNoV には S7-PP3 株を用いた。In silico 分子モデル間の RMSD 値は, プロテアーゼで約 1.0\AA , ポリメラーゼで約 1.3\AA であった。プロテアーゼの切断活性に必須のアミノ酸 (H, D/E, C, H), ポリメラーゼの RNA 合成活性に必須の YGDD モチーフと近傍の保存モチーフ A の立体配置は, U201 株と S7-PP3 株でほぼ一致していた。HuNoV のプロテアーゼ, ポリメラーゼの Shannon エントロピー値分布パターンは, 全長に渡り,

MuNoV のそれとほぼ一致していた。プロテアーゼとポリメラーゼの主鎖の折り畳みと活性部位アミノ酸の立体配置、保存部位と可変部位の位置、前駆体の切断反応、および RNA 合成反応に直接、間接に関わるアミノ酸の配置は、HuNoV と MuNoV 間でよく保存されていた。以上から、プロテアーゼ、ポリメラーゼの研究を推進する際、MuNoV は HuNoV のモデルとなり得る。

[横山 勝 (病原体ゲノム解析研究センター), 岡智一郎, 片山和彦, 遠矢幸伸 (日本大学), 神田忠仁, 佐藤裕徳]

(5) マウスノロウイルス検出のための nested RT-PCR 系の構築

公的データベースに登録されている 40 株以上のマウスノロウイルスのフルゲノム塩基配列中、高度に保存された領域を検索し、ポリメラーゼから構造タンパク質コード領域をターゲットとする nested RT-PCR 系を構築した。さらに国内の実験用マウスからマウスノロウイルス核酸を検出し、その遺伝子解析を行った。

[北島正章 (東大院工学), 岡智一郎, 遠矢幸伸 (日大獣医), 片山和彦]

(6) マウスノロウイルス検出のためのリアルタイム RT-PCR 系の構築

マウスノロウイルス核酸定量系を構築する目的で、ポリメラーゼと構造タンパク質の境界領域をターゲットとするリアルタイム RT-PCR 系を新たに構築した。nested RT-PCR でマウスノロウイルス陽性のサンプルについて糞便中核酸量を定量した。

[北島正章 (東大院工学), 岡智一郎, 遠矢幸伸 (日大獣医), 片山和彦]

(7) 大腸菌で発現させたマウスノロウイルス非構造、構造タンパク質に対する抗体の反応性評価

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 (Nterm, NTPase, VPg, Polymerase), 構造蛋白質 (VP1, VP2) 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て作成した部位特異抗体の反応性をウェスタンブロット法お

よび免疫染色法によって検討した。作成した抗体はいずれも良好な反応性を示した。また、構造タンパク質 (VP1) に対して作成した抗体はウイルス粒子の免疫沈降に使用可能であることも明らかになった。

[岡智一郎, 高木弘隆 (バイオセーフティ管理室), 片山和彦]

(8) マウスノロウイルス感受性細胞の検討

マウスノロウイルス増殖は一般的にマウスマクロファージ細胞株 RAW264.7 で検討されている。マウスノロウイルスの増殖指向性を検討する目的で、他のマウスマクロファージ細胞株 (J774-A1), その他のマウス由来細胞 (WEHI-3b, P3U1, 3T3-L1, HS-22), ハムスター由来細胞 (CHO-K1) におけるマウスノロウイルスの感染、増殖を細胞壊死の観察、および免疫染色で検討した。その結果、マウスマクロファージ系細胞でのみウイルス感染が起きていることを確認した。今後、増殖の認められたマウスマクロファージ細胞 2 種類について、ウイルス増殖をリアルタイム RT-PCR 法で検討する。

[岡智一郎, 高木弘隆 (バイオセーフティ管理室), 片山和彦]

4. ネコカリシウイルスに関する研究

(1) 大腸菌で発現させたネコカリシウイルス非構造タンパク質に対する抗体の反応性評価

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非構造蛋白質 (NTPase, VPg, Protease, Polymerase) に対応する遺伝子領域をそれぞれ大腸菌で発現させ、ウサギに免疫して作成した特異抗体を、ウイルス感染 CRFK 細胞の免疫染色およびウェスタンブロットに使用し、いずれも検出に使えることを確認した。

[岡智一郎, 高木弘隆 (バイオセーフティ管理室), 片山和彦]

(2) BRET を用いたネコカリシウイルス感染増殖検出系の構築

カリシウイルスの多く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。カリシウイルスの感染、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。この系では BRET センサーがウイルスプロテアーゼによって切断されることで rLuc から GFP へのエネルギー転移が起こらなくなるという原理を利用する。BRET センサーを安定発現する細胞株を確立した細胞に FCV を感染させたところ、添加ウイルス量に依存して BRET シグナルの変動 (GFP/rLuc ratio の減少) が起こることを確認した。本検出系はウイルス感染増殖に伴う、ウイルスプロテアーゼの活性を検出することから、ウイルスプロテアーゼ阻害物質だけでなく、ウイルス感染増殖を阻止する物質の検索に有用である。

[岡智一郎, 高木弘隆 (バイオセーフティ管理室), 遠矢幸伸 (日大獣医), 片山和彦]

(3) 改変ルシフェラーゼを用いた *in vitro* でのネコカリシウイルスプロテアーゼ活性検出系の構築

in vitro でのハイスループットなネコカリシウイルスプロテアーゼ阻害物質スクリーニングを行うため、最近開発された改変ルシフェラーゼ (GloSensor™: Promega) を用いたウイルスプロテアーゼ活性検出系を構築した。この系では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 GloSensor™ 中にクローニングし、このタンパク質がウイルスプロテアーゼによって切断されることで非切断時に比べて発光が大幅に増加するという原理を利用する。In vitro translation によって発現した基質 (改変ルシフェラーゼ) を、*in vitro* translation で発現させた FCV プロテアーゼと反応させることで、容量依存的にルシフェラーゼシグナルの増加が認められることを確認した。

[岡智一郎, 片山和彦]

(4) 改変ルシフェラーゼを用いたネコカリシウイルス

感染増殖検出系の構築

ネコカリシウイルス感染、増殖阻害物質のスクリーニング系構築のため、上記のネコカリシウイルスプロテアーゼ認識配列を組み込んだ改変ルシフェラーゼを安定発現する CRFK 細胞を確立した。この細胞に FCV を感染させたところ、添加ウイルス量に依存してルシフェラーゼシグナルの増加を認めた。本検出系は BRET と比較して高感度に FCV 感染を検出可能であった。本検出系も BRET の系と同様、ウイルス感染増殖に伴う、ウイルスプロテアーゼの活性を検出することから、ウイルスプロテアーゼ阻害物質だけでなく、ウイルス感染増殖を阻止する物質の検索に有用である。

[岡智一郎, 高木弘隆 (バイオセーフティ管理室), 遠矢幸伸 (日大獣医), 片山和彦]

5. カリシウイルスに関する研究

(1) カリシウイルスプロテアーゼ間で保存されている残基の同定、およびポリプロテイン切断活性への影響の解析

カリシウイルスは主に 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アミノ酸相同性は異なる属間では 30% 以下と低いが、全体構造は類似する。今回はシャノンエントロピー解析、構造モデルによって、カリシウイルスプロテアーゼ間でアミノ酸レベルあるいは立体配置的に共通して保存されている残基を同定した。現在、これらの残基に変異を導入し、ポリプロテイン切断活性への影響を検討している。

[岡智一郎, 横山 勝, 本村和嗣, 守 宏美, 中村浩美, 佐藤裕徳 (病原体ゲノム解析研究センター), 片山和彦]

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。2009年度は、エンテロウイルス同定用パネル血清 EP95 を 22 セット、エンテロウイルス単味抗血清 30 種類、コクサッキーA 群同定用 CF 腹水 2 セット、ポリオウイルス標準株 3 株、ポリオ標準血清 3 種類を配布した。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 19 回ポリオ実験室診断技術研修会を実施した。研修期間は 2010 年 1 月 18 日～2 月 5 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、計 3 名の他、個別研修として中華人民共和国からの参加者 3 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。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 122 検体およびラオス 86 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ィアの維持を確認した。

ウ) 2009 年 6 月 23-25 日に、WHO 本部(ジュネーブ)で行われた The 15th Informal Consultation on the Global Polio Laboratory Network 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]

エ) 2010 年 2 月 22 日-2 月 23 日に、WHO 西太平洋事務局(マニラ)で行われた The 2nd meeting on vaccine preventable diseases laboratory network in the WPRO に参加し WHO 西太平洋地域におけるポリオ実験室ネットワークにおける技術情報の交換を行った。

[清水博之]

オ) 2010 年 3 月 9 日-3 月 13 日に、クアラルンプールで行われた WHO Informal Consultation Meeting for Hand Foot Mouth Disease に参加し WHO 西太平洋地域における手足口病ガイドラインの作成作業を行った。

[清水博之]

カ) 2010 年 3 月 23-3 月 25 日に、イギリス NIBSC 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 VPD 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 : 2 名、甘肅 CDC : 1 名に対し 2 週間の研修を行った

[吉田弘, 有田峰太郎, 西村順裕, 清水博之]

ク) 2009 年 10 月 21-10 月 22 日に行われた中国省級ポリオ実験室レビュー(重慶市)に JICA 専門家として参加し、実験室査察の結果を WHO および JICA に報告した。

[清水博之]

2. 西太平洋地域の 2009 年のポリオウイルス分離状況

2009 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 208 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) 新規ポリオウイルス・エンテロ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，糞便等の臨床検体から，直接ポリオウイルス・エンテロ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．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実験室への導入が可能な簡便なウイルス検出法(RT-LAMP 法，ポリオウイルス特異的 PA 法等)に関する技術開発を試みている．

[有田峰太郎，清水博之]

(2) 便検体中のエンテロウイルスを含む便検体を同定するための RT-LAMP 法の開発

全世界的なポリオウイルス (PV) 根絶計画の中で，小児麻痺症例を確定診断するために急性弛緩性麻痺症例の便検体からの PV 分離・同定が必須とされている．PV が含まれる便検体を迅速かつ簡便に同定するために，エンテロウイルスの 5' NTR 部分を検出するための RT-LAMP 法を開発した．開発した方法の検出限界は 400 コピー以下であり，PV を含む C 群のエンテロウイルスを効率よく検出することができた (PV 陽性の便検体: 15/16, PV 以外の C 群エンテロウイルス: 13/14) . そのため，本方法は，多数の便検体から，PV を含むエンテロウイルス陽性の便検体を選別する方法として有用であることが示唆された．

[有田峰太郎，Hua Ling (重慶市 CDC)，Donmei Yan (中国 CDC)，西村頼裕，吉田 弘，脇田隆字，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った．前年度(2007 年度)は累積接種率が若干低い傾向が認められたが，2008 年度には，累積接種率は，ほぼ回復した．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) 中国広東省における環境ウイルスサーベイランスによるポリオ/エンテロウイルス分離

中国広東省は流動人口を抱え疾患サーベイランスによる感染症流行像の把握は困難な状況である．広州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継続している．2008 年 4 月から 2010 年 2 月までの流入下水，河川水調査を行ったところ，ほぼ毎月ワクチン由来株が下水から分離されることから，生ワクチン接種が定期的の実施されているアセスメントツールとしての有用性を示唆した．

[吉田 弘，帖佐 徹 (九州産業衛生協会)]

(5) 中国山東省における環境ウイルスサーベイランスの導入研究

山東省 CDC との共同研究にて 2008 年 2 月より継続して主として下水を材料としてエンテロウイルスの分離を行っている．下水由来の HEV-B に属するエンテロウイルスと同時期に分離された無菌性髄膜炎患者由来株について，VP1 領域の塩基配列を比較したところ，同一のクラスターに属することが確認され，環境ウイルスサーベイランスの有用性が認められた．また 2009 年 5

月には 3 型と 2 型のワクチン由来組み替えポリオウイルスが下水から検出された。同時期の AFP サーベイランスからは検出されなかったことから、環境サーベイランスは高感度にヒト集団中に存在するウイルスを検出する手法として有用であることを示唆している。

[吉田 弘, 帖佐 徹 (九州産業衛生協会)]

(6) ポリオワクチン接種後に発症した小児の急性弛緩性麻痺症例

患児 (6 ヶ月, 男児) は 2007 年 12 月 3 日より発熱, 同 6 日に両下肢急性弛緩性麻痺が出現し, 活気の低下, 哺乳力の低下がみられた。11 月中旬に 1 回目のポリオワクチン接種を受けていたため, 12 月 12 日~15 日に複数回採取した糞便からウイルス分離を試みた。細胞変性効果のみられた培養上清をさらに L20B 細胞に接種しウイルス増殖を確認すると共に中和法によって同定を行った。その結果, 複数の糞便からポリオウイルス 2 型及び 3 型が分離された。分離されたポリオウイルスの VP1 コード領域における遺伝子解析を行った結果, 各型に対応する Sabin 株との変異率はそれぞれ 1.0%未満であり, ポリオウイルスワクチン株と判定した。患児の弛緩性麻痺は, ある程度の回復がみられたもの残存麻痺が認められ, VAPP の可能性が高いと考えられた。疫学調査の結果, 患児の家族を含む接触者に新たな発症者はなく, 二次感染も認めなかった。VAPP の発生リスクを抑えるため, 不活化ポリオワクチンの早期導入が必要である。

[三好正浩, 岡野素彦 (道立衛生研), 西村順裕, 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見。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)

のライブラリー発見細胞を 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たところ, Jurkat 細胞 cDNA ライブラリーから EV71 受容体候補分子が同定された。

[西村順裕, 下島昌幸 (東大医科研), 脇田隆字, 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見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唆された。

[西村順裕, 脇田隆字, 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, 脇田隆字, 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 以外の受容体を用いたメカニズムにより EV71 に感染することが示唆され、RD 細胞や Vero 細胞に発現する scavenger receptor B2 (SCARB2) が EV71 の機能的受容体であるとする小池らの報告を支持する結果といえる。

[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 とも結合した。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 増殖に必要な EV71 ゲノム変異の解析

EV71 分離株 5 株を L-PSGL-1.1 細胞に感染させたところ、RD 細胞等で継代した EV71 分離株 (EV71-org) では EV71-1095 株のみ PSGL-1 依存的増殖を示したが、他の 4 株は顕著な増殖を示さなかった。一方、L-PSGL-1.1 細胞にて一度複製させた EV71 (EV71-LPS1) ではどの分離株も PSGL-1 依存的に増殖した。EV71-org と EV71-LPS1 の全長のアミノ酸配列を比較したところ、4 株の EV71-LPS1 は VP2-K149

に共通のアミノ酸置換を有していた。したがって、VP2-149 におけるアミノ酸置換が L-PSGL-1.1 細胞における EV71 の効率的増殖に関与していることが示唆された。

[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 脳炎を含む手足口病流行における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を解析する。現在、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 PSGL-1 および SCARB2 受容体分子の分布・局在および病理学的特徴の解析を行っている。

[Ong Kien Chai, Wong Kum Thong (マラヤ大学), 西村順裕, 清水博之]

(8) エンテロウイルス 71 受容体 SCARB2 の同定

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、その遺伝子産物である scavenger receptor B2 (SCARB2) が、EV71 の機能的受容体であることを明らかにした。

SCARB2 は、多くのヒト細胞・組織に発現しており、EV71 だけでなくコクサッキーA16 の受容体としても機能することが示された。

[山吉誠也, 小池 智(都臨床研), 清水博之]

(9) 新規抗エンテロウイルス活性を示す化合物の同定

ワクチンが開発されていないエンテロウイルス 71 (EV71) および生ワクチンの副作用が問題となっているポリオウイルス (PV) については、抗ウイルス薬は感染の予防および治療の有効な手段となることが期待される。天然物誘導体から成る化合物ライブラリーを用いたスクリーニングにより、EV71 および PV に対して阻害活性を示す化合物を同定した。この化合物は、PV および EV71 の複製を阻害し、かつ EV71 の感染初期を阻害する新規の抗エンテロウイルス活性を示した。

[有田峰太郎, 武部 豊(エイズ研究センター), 脇田隆字, 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) 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

ヘルパンギーナおよび手足口病と診断された患者由来咽頭ぬぐい液から原因となる HEV-A の多くは、HEp-2, RD-18S, Caco-2, Vero 細胞では分離できな

かった。これに対し、エンテロウイルス間で多様性のある VP1 領域を増幅する CODEHOP VP1 RT-snPCR 法では、ヘルパンギーナ患者の 9 検体のうち 7 検体からコクサッキーウイルス A3 (CV-A3) 1 株, CV-A5 が 4 株および 2 株の CV-A6 が同定され、手足口病患者由来検体からは、55 検体中 51 検体から CV-A16 が 50 株, CV-A3 が 1 株同定された。HEV-A に感受性の高い RD-A 細胞を用いて、ヘルパンギーナおよび手足口病患者由来咽頭ぬぐい液 64 検体からウイルスの再分離を試みたところ、ヘルパンギーナ患者由来検体から CV-A5 が分離され、手足口病患者由来 55 検体のうち、6 検体から CV-A16 が分離され、1 検体からは CV-A16 と CV-A5, 2 種類のウイルスが分離同定された。さらに、冬期普通感冒の主要な原因ウイルスであり 100 以上の血清型が存在するヒトライノウイルス (HRV) のうち 48 血清型について、CODEHOP VP1 RT-snPCR 法の検出同定率を検討したところ、供試した全ての血清型において同定可能であった。

[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]

(12) 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、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。現在までに、脳、及び肝臓のグルタチオンペルオキシダーゼ活性について、セレン充足餌を与えた 25 日齢マウスに対して、セレン欠乏餌を与えた 25 日齢マウスは、有意に低いことを明らかにした(脳: $p < 0.05$, 肝臓: $p < 0.0005$)。これより、交配開始から胎児期を経て、授乳期までの間、

母親マウスがセレン欠乏餌を食べ続けた場合、その仔マウスの肝臓、及び脳中セレン濃度がセレン充足餌を食べ続けた場合よりも低くなることが確認された。現在、EV71 感染実験を行い、セレン欠乏および充足条件下での病原性発現およびウイルス増殖について比較解析を行っている。

[小林紗弥加, 渡辺知保(東大医学系研究科), 清水博之]

(13) 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、どの遺伝子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]

(14) 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、Benschop らの方法に基づいた 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]

(15) 環境水中からのヒトパレコウイルス検出と地域流行との関連

ヒトパレコウイルス (HPeV) は、これまで1型~6型の遺伝子型が知られているが、最近、新たに7型, 8型が報告された。血清疫学的解析や病原微生物検出情報等から、我が国では1型, 3型, 6型の不顕性感染が多いことが予想されている。下水流入水中の HPeV を検出し、地域流行との関連性を調べた。下水流入水2Lを毎月1回採取し、フィルター吸着溶出法で濃縮した。濃縮液から RNA を抽出し、HPeV1~6 を検出する Real-time PCR 法を施行した。濃縮液を RD-18s 細胞, MA104 細胞, Vero 細胞および HEp-2 細胞に接種し、細胞変性効果を指標にウイルス分離を試みた。下水流入水中から、平成18年は8月~11月までの4試料, 平成19年は9月~12月までの4試料, 平成20年は6月~12月までの6試料と平成21年1月の1試料から HPeV 遺伝子が検出された。培養細胞によるウイルス分離は陰性であった。病原微生物検出情報での HPeV 検出は、主に5月~11月に報告されているが、今回、下水流入水から検出された期間もほぼ一致しており、この時期、HPeV が顕性・不顕性に伝播していることが示唆された。

[町田早苗 (埼玉医大), 岩井雅恵, 滝澤剛則 (富山県衛生研究所), 西村順裕, 清水博之]

(16) 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 による中枢神経合併症の報告はまれである。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留意する必要がある。

[實藤雅文, 楠原浩一(九大), 西村順裕, 清水博之]

(17) ヒトカルジオウイルス国内分離株の遺伝子解析

近年、カルジオウイルス属に分類される新たな腸管ウイルス(Saffold virus)の検出が世界各地で報告されている。日本でも、この新たなヒトカルジオウイルスの検出が、最近報告されているが、我が国における伝播実態と特定疾患への関与は明らかでない。高知県で、無菌性髄膜炎および手足口病患者より分離された不明ウイルス 2 株について、RDV 法による非特異的遺伝子検出により、Saffold virus 様遺伝子が同定された。そこで、いままで報告されている Saffold virus 遺伝子をもとにプライマーを作製し、分離株の遺伝子解析を行った。カプシド領域の遺伝子解析により、分離ウイルス 2 株は、Saffold virus 3 型に近縁であることが示唆された。Saffold virus 分離株は、LLC-MK2 細胞および HeLa 細胞において CPE の発現を伴わない増殖したが、他のヒト細胞で顕著なウイルス増殖は認められなかった。

[細見卓司(高知県衛生研究所), 水谷哲也(ウイルス一部), Naeem Asif, 西村順裕, 清水博之]

(18) パキスタンの糞便検体からのヒトカルジオウイルスの検出と遺伝子解析

近年、カルジオウイルス属に分類される新たな腸管

ウイルス(Saffold virus)の検出が世界各地で報告されている。パキスタンにおける AFP サーベイランスにより採取された糞便検体のうち、パキスタン NIH にてポリオウイルスおよびエンテロウイルスを検出した糞便検体以外の検体から、Saffold virus 遺伝子検出およびウイルス分離を試みた。Saffold virus 特異的 RT-PCR およびリアルタイム PCR システムにより、Saffold virus 遺伝子が高頻度に検出された。LLC-MK2 細胞および HeLa 細胞を用いたウイルス分離を試みたところ、多数の CPE 因子が検出されたが、解析の結果、ほとんどが非ポリオエンテロウイルスによる CPE であることが示された。糞便中の Saffold virus は、LLC-MK2 細胞および HeLa 細胞における増殖効率が低く、通常的手法ではウイルス分離は困難であることが明らかとなった。糞便中から直接 Saffold virus 遺伝子を増幅し、遺伝子解析を行ったところ、これまでに報告されている以上に多様な遺伝子型の Saffold virus の存在が明らかとなった。Saffold virus は、ヒト腸管ウイルスとして広範に伝播していることが示唆された。今後、より詳細なウイルス学的解析が必要とされる。

[Naeem Asif, 西村順裕, 清水博之, Syed Sohail Zahoor Zaidi (パキスタン NIH)]

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状況調査

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、WHO は「野生株ポリオウイルスの実験室封じ込めに関する世界的行動計画」を策定し、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。我が国では、西太平洋地域における野生株ポリオウイルス伝播の終息を受け、2000-2002 年にかけて大規模かつ広範な野生株ポリオウイルス保有施設調査が行われたが、調査票の全体的な回収率が低く、調査精度とその後のフォローアップに関する多くの問題

点が指摘されていた。2000-2008年における各種の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を保有する可能性のある施設をリストアップしたうえで、所管省庁の了解のもと各施設に対し保有状況調査を実施し、野生株ポリオウイルス感染性材料保有施設を特定した。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を作成し、WHO 西太平洋地域ポリオ根絶認定委員会に提出した。その結果、2008年12月、WHO 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。世界ポリオ根絶計画が進展に伴い、保有施設リストのアップデートを今後も継続する必要がある。

[小林一司, 大坪寛子(厚生労働省), 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21年度は6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) スリランカのA型肝炎流行における疫学調査

2009年5月から発生したスリランカに於けるA型肝炎流行の疫学調査を行っている。この大流行の要因としてスリランカ内戦終結に伴う捕虜の解放、難民キャンプの形成、軍隊内の抗体保有率の低下と感染予防措置の不備が挙げられる。同じく抗体保有率が低下しつつある一般住民や国際平和協力などで先進国から派遣される人達への影響を最小限にとどめるため、このようなケースの調査は重要である。

[清原知子, Dahanayaka N (スリランカ・Rajarata 大学), 吉崎佐矢香, 佐藤知子, 石井孝司, 脇田隆字]

(2) 自己溶解性マイクロニードルアレイ(MNA)による抗HAV抗体の誘導

不活化A型肝炎ウイルスを主剤とするMNAの作成法の検討、マウス免疫及び血清中の抗HAV抗体測定を行った。MNA接種群の抗体陽転率(100%)は対象とした皮下接種群(60%)より高く、効果的なワクチン投与方法と考えられた。

[清原知子, *内藤誠之郎, *落合雅樹, *片岡紀代, 佐藤知子, 石井孝司, 脇田隆字(*検定検査品質保証室)]

(3) 2010年春季に日本で多発したA型肝炎の分子疫学的解析

日本でのA型肝炎患者数は2007年以降非常に低いレベル(150人/年程度)で推移していたが、2010年は3月から全国各地でA型肝炎が多発している。全国の地方衛生研究所と共同で、A型肝炎患者の糞または血清からA型肝炎ウイルス(HAV)ゲノムの配列を決定し、流行状況を分子疫学的に解析したところ、流行株はgenotype 1Aの2つのクラスターと3Aの1つのクラスターに大部分が分類されることが判明した。本年にA型肝炎が多発した理由は、従来日本に土着していた株(genotype 1A)に加え、別の新たな1A株が日本に侵入し、また韓国で大流行した株(3A)も一部日本に侵淫してきたためであると考えられた。

[石井孝司, 清原知子, 吉崎佐矢香, 佐藤知子, *島田智恵, *中村奈緒美, *多田有希, **野田 衛, 脇田隆字(*感染症情報センター, **国立衛研食品衛生管理部), 他23地方衛生研究所との共同研究]

2. B型肝炎ウイルス(HBV)に関する研究

(1) HBV放出を評価する定量系の樹立

HBV産生培養細胞株を用いて、培養液中HBV DNAをリアルタイムPCR法により定量した。本法によってHBV DNAが100コピー以上のサンプルに関しては再現よくHBV DNAを定量できることがわかった。

[渡士幸一, 脇田隆字]

(2) HBV産生細胞のリクローニング

HBV 増殖阻害剤のスクリーニングに使っている
2.2.15 細胞 (HepG2 由来) のリクローニングを試みた。
各クローンの HBs 抗原産生量を測定したところ、産生
能が異なる複数のクローンを得た。最も HBs 抗原産生
能が高いクローンは安定した抗原産生能を示し、薬剤
スクリーニングにも使用可能であった。

[清原知子, 渡士幸一, 石井孝司, 脇田隆字]

3. C 型肝炎ウイルス (HCV) に関する研究

(1) 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、408 種類のヒトプ
ロテインキナーゼのうち、89 種類 (うち 79 種類がセリン/
スレオニンプロテインキナーゼ) 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 (愛媛大), 遠藤弥重太 (愛媛
大), 鈴木哲朗, 加藤孝宣, 脇田隆字]

(2) NS5A のリン酸化に関与する新規セリン/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 [32 P]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により NS5A のリ
ン酸化を解析した。その結果、9 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 2 であ
った。

[政木隆博, 澤崎達也 (愛媛大), 遠藤弥重太 (愛媛
大), 鈴木哲朗, 加藤孝宣, 脇田隆字]

(3) HCV の生活環に関与するセリン/スレオニンプロ
テインキナーゼの同定

AlphaScreen 解析, *in vitro* リン酸化アッセイによ
りスクリーニングされた 9 種類のキナーゼについて、

それらの細胞内発現を siRNA を用いてノックダウンし
たところ、4 種類 (CK11, CK12, CK1, CK22) におい
て HCV ゲノム複製の有意な低下が認められた (サブゲ
ノミックレプリコン細胞を用いた検討)。HCV 感染細
胞を用いた検討では、感染性ウイルス粒子の産生量
が CK1 及び CK1 のノックダウンにより著明に減少し、
CK22 のノックダウンにより中等度減少した。

[政木隆博, 鈴木哲朗, 加藤孝宣, 脇田隆字]

(4) NS5A との相互作用により活性調節を受ける新規
プロテインキナーゼの探索

HCV 蛋白がプロテインキナーゼと相互作用すること
でキナーゼ活性を調節し、ウイルス性肝炎の病態形
成に関与することが知られている。今回、
AlphaScreen 解析において NS5A との相互作用が強固
であったプロテインキナーゼを対象に、NS5A との相
互作用により活性調節を受ける新規キナーゼの探索
を試みた。キナーゼ基質のリン酸化をリン酸化抗体を
用いて解析し、NS5A 発現細胞において負に活性調節
を受けるプロテインキナーゼを同定した。

[政木隆博, 加藤孝宣, 脇田隆字]

(5) 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, 鈴木哲朗, 加藤孝宣, 脇田隆字]

(6) 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, 鈴木哲朗, 加藤孝宣, 脇田隆字]

(7) 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結合蛋白を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, 鈴木哲朗, 加藤孝宣, 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リ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, 鈴木哲朗, 加藤孝宣, 脇田隆字]

(9) HCVの複製に重要な領域の解析

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株を比較し、効率の良い複製に重要な領域および変異を同定した。その結果、NS3ヘリカーゼをJFH-1型にした場合、NS5B領域の3つのアミノ酸

変異と、3' UTR内の可変領域の変異、およびJFH-1型の短いポリU領域が効率の良いウイルス複製に重要であることが明らかとなった。

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

(10) 培養細胞で非増殖型のウイルス株を増殖型にする変異の同定

培養細胞での増殖がみられないHCV J6CF株を増殖可能なウイルスに改変するために必要な点変異の同定を試みた。ウイルスRNAを導入した細胞を長期に培養すると、ウイルスゲノムに適応変異が導入された。それらの変異の効果を調べた結果、新たにNS4A領域の点変異がウイルスゲノム複製、粒子形成の効率を上昇させることが明らかとなった。

[村山麻子, 伊達朋子, 加藤孝宣, 鈴木哲朗, 脇田隆字]

(11) HCVの遺伝子型2b/2a間でのキメラウイルスの作製と解析

HCVの遺伝子型2b/2a間で作製したキメラ遺伝子を培養細胞に導入し、長期培養した結果、得られた変異を解析した。コア領域の適応変異により、ウイルスゲノムの複製能は変化しなかったが、培養上清中への感染性ウイルス粒子産生が増加した。詳細な検討の結果、この変異により細胞内でのウイルス粒子の形成効率が上昇していることが明らかとなった。この変異を導入することにより、感染性ウイルスが効率よく作られた結果、ウイルス感染が素早く広がり、2b/2aキメラウイルスを効率的に得られるようになった。

[村山麻子, 伊達朋子, 鈴木哲朗, 加藤孝宣, 脇田隆字]

(12) 新規細胞株を用いた効率の良いHCV培養系の作製

ウイルスの感染予防ワクチンの開発には効率の良いウイルス大量培養系が不可欠である。現在の標準的に使われている細胞株では増殖可能なウイルス株に限

られており、またその増殖効率も十分ではないため、新たな細胞株を用いたより効率の良いHCV培養増殖系の構築を試みた。この細胞株を利用すると従来使われているHuh7.5.1細胞と比較して約10倍のウイルスが得られた。詳細なメカニズムは現在解析中であるが、少なくともこの細胞株では、細胞内でウイルス粒子がより効率的にできており、感染の広がるスピードが早くなっていることが明らかとなった。

[村山麻子, 金ソレイ, 加藤孝宣]

(13) JFH-1 coreと種々の株のNS5Aとの相互作用の解析

CoreとNS5Aの相互作用はHCV感染性粒子産生の初期段階に重要である事が知られている。JFH-1株及び、野生型では培養細胞内で増殖しないH77, Con1, J6CF, MA株のNS5AとJFH-1のcoreを293T細胞に強制発現させ、coreによる免疫沈降法により相互作用を比較した。その結果、H77, Con1, MA株のNS5Aにおいてcoreとの相互作用の増強を認めた。一方J6株ではJFH-1株と同等であった。

[岡本有加, 政木隆博, 村山麻子, 加藤孝宣, 脇田隆字]

(14) JFH-1株におけるNS5Aの置換がウイルス増殖に与える影響

JFH-1株のNS5A全体を1a型H77c株, 1b型Con1株, 2a型J6CF株, 2b型MA株にそれぞれ置き換えた全長キメラ株を作製し、これらの増殖を検討した。H77c株に置き換えたキメラ株では複製能及び粒子産生ともに変化せず、Con1株に置き換えたキメラ株では、複製、感染性粒子産生に低下が見られた。一方、J6及びMA株に置き換えたキメラ株では、複製能に変化は無く感染性粒子産生のみ上昇した。

[岡本有加, 政木隆博, 村山麻子, 加藤孝宣, 脇田隆字]

(15) JFH-1株におけるNS5AのC末端領域の置換がウイルス増殖に与える影響

J6CF株及びMA株は野生型では培養細胞内で増殖出来ないが、JFH-1株のNS5Aをこれらの株に置換すると感染性粒子産生能が上昇する。この原因としてNS5A-5B間の切断効率の変化が考えられた。これを確認するため、JFH-1株のNS5AのC末10アミノ酸をJ6型、或はMA型にした変異体を作製し、増殖能を検討した結果、この領域の置換のみで感染性粒子産生の上昇を認めた。

[岡本有加, 政木隆博, 村山麻子, 加藤孝宣, 脇田隆字]

(16) JFH-1株のNS5Aの置換がNS5A-5B切断効率に与える影響の解析

JFH-1株のNS5Aを他の株に置換した際の感染性粒子形成効率の上昇が、NS5A-5B間の切断効率の差に因るかを検証するため、パルスチェイス法により切断効率の比較を行っている。Huh7FVC細胞にT7RNAポリメラーゼ組み替えワクシニアウイルスを感染させ、JFH-1のサブゲノミックレプリコンをDNAトランスフェクションした系で条件の至適化を行った。今後は決定した条件で、野生型と変異体を用いて検討を行う。

[岡本有加, 政木隆博, 村山麻子, 加藤孝宣, 脇田隆字]

(17) 急性肝炎患者血清から分離したHCV株の解析と全長コンストラクトの構築

急性肝炎患者血清からHCV RNAを抽出し、その塩基配列を見たところ、このHCV株はgenotype 2bに属することがわかった。そこでHCV全長を含むようにPCRを行い、そのフラグメントを5クローンずつシーケンスし、そのHCV株のコンセンサス配列を決定した。PCRで得られたフラグメントをつなぎ合わせ全長のcDNAを作製した。

[金ソレイ, 藤原圭 (名古屋第二赤十字病院), 加藤孝宣, 脇田隆字]

(18) 細胞内の活性酸素種を検出する系の確立

培養細胞内の活性酸素種を直接検出できる系を検討した。細胞内の活性酸素種と非特異的に反応し、蛍光

を発するプローブとしてCM-H₂DCFDAを用いた。まず、ポジティブコントロールとして過酸化水素処理を行い、活性酸素種の産生量の変化を調べた。その結果、過酸化水素により活性酸素種の産生量が2倍程度上昇する結果が得られた。そこで、HCV JFH-1ウイルスの感染による影響を検討した。その結果、HCV感染により活性酸素種の産生量の上昇がみられた。

[金ソレイ, 加藤孝宣, 脇田隆字]

(19) Genotype 1b株のサブジェノミックレプリコンを用いた適応変異の影響の検討

Genotype 1b株のSGRにルシフェラーゼ遺伝子を導入し、ルシフェラーゼレポーターシステムで複製活性を測定した。Genotype 1b株はwild typeでは増殖能が認められなかったため、ネオマイシン耐性遺伝子を持ったサブジェノミックレプリコンの長期培養で得られた適応変異を導入し、複製活性に及ぼす影響を検討した。その結果、NS3とNS5A領域の適応変異を導入することにより、wild typeに比べ複製活性が著しく上昇することが確認できた。

[金ソレイ, 伊達朋子, 加賀美奈子, 加藤孝宣, 脇田隆字]

(20) Genotype 1b株のcore領域のアミノ酸変異がHCVの複製に及ぼす影響の検討

coreの70番, 91番目のアミノ酸の変異によってインターフェロン治療に対する感受性の違いが報告されている。そこで、それらのcoreのアミノ酸変異がHCVの複製に及ぼす影響を検討した。ルシフェラーゼレポーター遺伝子を持つgenotype 1b株の全長レプリコンにcore領域の変異を導入し、複製活性を細胞内のルシフェラーゼ活性を測定することで検討した。その結果、コア領域のアミノ酸変異の有無により、その複製に違いは認めず、core領域の変異の影響はこの方法では検出できなかった。

[金ソレイ, 加藤孝宣, 脇田隆字]

(21) Genotype 1b株, genotype 2a株のサブジェノミックレプリコンを用いたインターフェロン感受性の比較

適応変異を導入したgenotype 1b株とgenotype 2a株のサブジェノミックレプリコンを用いて、IFN- α とIFN- λ による複製活性の抑制効果を検討した。その結果、IFN- α はgenotype 1b株, genotype 2a株共に複製活性を抑制した。それと同じく、IFN- λ も両株の複製活性を抑制した。また、IFN- α とIFN- λ を同時処理することにより相加的な抑制効果がみられた。

[金ソレイ, 政木隆博, 加藤孝宣, 脇田隆字]

(22) 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

JFH-1株が分離された患者血清のチンパンジーへの接種実験によりいくつかの適応変異が同定された。それらの変異をJFH-1株に導入し、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、これらの変異により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, 渡邊治雄, 脇田隆字]

(23) 小胞体関連蛋白分解 (ERAD) 因子がHCVの粒子生成に与える影響の検討

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EDEMIの発現が誘導された。このEDEMIの発現を押さえることにより、細胞内のHCVエンベロープ蛋白の発現レベルが上昇し、その結果感染性ウイルス粒子が多く生成されることがわかった。従ってHCV粒子産生過程にERAD経路が関与していることが示唆された。

[Saeed Mohsan, 加藤孝宣, 鈴木哲朗, 脇田隆字]

(24) 分泌型レポーターを用いたサブジェノミックレプリコンシステムの構築

HCVの複製を抑制する薬剤のハイスループットスクリーニングに向けて、分泌型レポーターを持ったHCV JFH-1株のサブジェノミックレプリコンを作製した。分泌型ルシフェラーゼを組み込んだJFH-1レプリコンと分泌型アルカリフォスファターゼを組み込んだJFH-1増殖不能変異導入レプリコンのRNAを培養細胞内に導入し、培養上清中のルシフェラーゼおよびアルカリフォスファターゼを測定した。時間経過とともにルシフェラーゼ活性のみが上昇し、レプリコンの増殖をモニターが可能であった。

[金ソレイ, 加藤孝宣, 脇田隆字]

(25) ISDR変異がHCV JFH-1株の感染増殖とインターフェロン感受性に与える影響の検討

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HCV JFH-1株の培養細胞内での感染増殖に与える影響を検討した。JFH-1株のISDR部分を遺伝子型1bのワイルドタイプ(WT), WTの配列に比べ7つの変異を持ったもの, J6タイプのものそれぞれに置換した株を作成し、培養細胞での増殖能を検討した。その結果、ISDRの置換によりJFH-1株の増殖能には変化を認めず、またインターフェロンの感受性に与える影響も確認できなかった。

[杉山奈央, 加藤孝宣, 脇田隆字]

(26) コア領域のアミノ酸変異がHCV JFH-1株の感染増殖とインターフェロン感受性に与える影響の検討

HCV JFH-1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コア領域のアミノ酸変異がHCVの増殖およびIFN感受性に与える影響を検討した。JFH-1株のコア領域aa70, aa91それぞれのアミノ酸をミュータントタイプに置換した株を作成し、培養細胞での増殖能を検討した。その結果、コア領域のアミノ酸変異の導入によりJFH-1株の増殖能に変化を認めず、またインターフェロンの感受性にも影響を与えなかった。

[杉山奈央, 加藤孝宣, 脇田隆字]

(27) JFH-1患者血清感染チンパンジーで認めた変異がヒト肝細胞移植マウスでの増殖能に与える影響の検討

JFH-1株が分離された患者血清のチンパンジーへの接種実験によりいくつかの適応変異が同定された。それらの変異をJFH-1株に導入し、ヒト肝細胞移植マウスでの感染増殖に与える影響を検討した。チンパンジー内で誘導された生体内適応変異株は、ヒト肝細胞移植マウスで通常のJFH-1株と同程度の複製増殖能を示した。従って、生体内で誘導された適応変異では、生体内での増殖複製能は維持されていると考えられた。

[Mohsan Saeed, 今村道雄(広島大学), 茶山一彰(広島大学), 加藤孝宣, 渡邊治雄, 脇田隆字]

(28) HCV感染細胞のアポトーシス検出法の確立

HCV感染がアポトーシスに与える影響を検討するため、感染細胞と非感染細胞それぞれでアポトーシス細胞を個別に検出する方法を確立した。HCV JFH-1株およびその生体内変異株をHuh7.5.1株に遺伝子導入し、その後TNF- α やFAS ligandにアクチノマイシンDを加えアポトーシスを誘導した。その後アポトーシス細胞をTUNEL染色で、HCV感染をNS5a染色で検出しFACSで解析を行った。その結果、生体内での適応変異を得た株では、感染細胞でアポトーシスの誘導が抑制されていた。

[椎名正明(東北大学), Mohsan Saeed, 杉山奈央, 加藤孝宣, 脇田隆字]

(29) JFH-1株培養細胞適応変異株の分離

JFH-1株を培養細胞に導入し長期培養を行うことにより適応変異株を誘導した。しかし、この適応変異のダイレクトシーケンスにより同定された変異のみでは、その適応ウイルスの増殖能を再現できなかった。そこで、適応ウイルスを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変

異を同定し、JFH-1株に導入することにより適応ウイルスと同レベルの感染増殖能を持つウイルスが得られた。従って限界希釈再感染法による適応変異ウイルスの分離は、適応変異の同定に有用と考えられた。

[杉山奈央, 加藤孝宣, 脇田隆字]

(30) HuH-7細胞株を用いたJFH-1株の複製と感染性の検討

HuH-7細胞の様々な株でHCV JFH-1株の複製と感染性について検討した。それぞれの細胞株にJFH-1全長RNAを導入したところ、多くの細胞株でHuh7.5.1細胞よりも強い複製が観察された。また感染感受性について検討したところ、主要なレセプターであるCD81の発現はHuh7.5.1細胞ほど高くなく、等量のウイルスを感染させた時に観察されるフォーカスの数も少なかった。現在、これらの細胞の特徴について解析中である。

[菅野美津子(東芝RDC), 吉村齊湖(東芝RDC), 杉山奈央, 村山麻子, 金ソレイ, 加藤孝宣, 脇田隆字]

(31) インターフェロン(IFN)治療反応性患者中のHCV株の変異が培養細胞内での増殖複製に与える影響

IFN治療に反応性の患者と非感受性の患者において、感染しているHCV株の違いを比較したところ、E1とNS2領域の変異が検出された。そこでJFH-1株を用い、培養細胞内でこれらの変異の増殖複製に与える影響を検討した。その結果、E1の変異の導入により複製能は上昇したが感染性ウイルス粒子の産生は低下した。またNS2の変異導入により、複製能と感染性ウイルス粒子生成能の両方が上昇していた。これらの変化がIFN治療感受性に関与している可能性が示唆された。

[中本晋吾(千葉大学), 杉山奈央, 加藤孝宣, 脇田隆字]

(32) HCVコア蛋白質とゲノムRNAとの相互作用 HCVゲノムRNA内のパッケージングシグナルを明らかにするため、精製HCV C末端欠失コア蛋白質(1-82aa),

及びその変異体(3カ所のクラスター内の正に荷電したアミノ酸残基のアラニン置換変異体(m1, m2, m3))と、高次構造を取る精製5' UTR, 及び3' UTR RNAを用いた。その結果、コア蛋白質は5' UTRのIII₁acd領域、また3' UTRのstem loop I領域と効率良く結合した。ゲノムRNAとの結合にはコア蛋白質のm2, 及びm3領域が重要であることを示唆する結果を得た。

[松田麻未, 下池貴志, 安東友美, 鈴木亮介, 鈴木哲朗]

(33) HCV産生を抑制する抗コアイントラボディの作製

HCVの構造蛋白質であるコアに対するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマから、抗体の可変部の遺伝子をクローニングし、シングルドメインまたはscFvを発現するプラスミドを作製した。これらの抗体分子とコア蛋白質との相互作用を免疫沈降法によって確認した。また抗体分子を発現させる事により、感染細胞からの感染性HCV産生量の減少が認められた。この事から、コア蛋白質を認識するイントラボディは培養細胞におけるHCVの増殖を抑制出来る事が示唆された。

[斎藤憲司, 鈴木亮介, 鈴木哲朗, 脇田隆字]

(34) 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結合領域はCore蛋白質のaa 1-43, aa 92-111, hnRNPH1結合領域はCore蛋白質のaa 1-43, aa 66-91であった。

[村上恭子, 勝二郁夫(神戸大微生物), 小池和彦(東大消化器内科), 石井孝司, 鈴木哲朗, 脇田隆字]

(35) 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 に結合する RNA motif については既に報告があり, 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 領域に存在する. 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, hnRNP F と hnRNP H は HCV IRES IIIId 領域に結合することが明らかになった.

[村上恭子, 阿部克俊, 勝二郁夫 (神戸大微生物), 小池和彦 (東大消化器内科), 石井孝司, 鈴木哲朗, 脇田隆字]

(36) HCV 感染性粒子産生への HnRNPH1/F の影響の解析

HCV JFH1 産生系において hnRNPH/F それぞれを強制発現した場合と siRNA で内在性 hnRNPH1/F をノックダウンしウイルス産生への影響を解析した. hnRNP H は HCV 感染性粒子産生に促進性に機能し, hnRNP F は HCV 感染性粒子産生に抑制性に機能することが示唆された.

[村上恭子, 阿部克俊, 勝二郁夫 (神戸大微生物), 小池和彦 (東大消化器内科), 石井孝司, 鈴木哲朗, 脇田隆字]

(37) HCV E2 タンパク質の結晶化

293GnTI(-)細胞で作製, 精製したマンノース型の E2dTM (膜欠失型) を用いて結晶化のスクリーニングを行った. 用いた E2dTM は多量体を形成したこと, ウイルスに対して感染阻害活性を示さないことから, 立体構造が正常ではないと考えられる. そこで異なる細胞発現系についても同時にタンパクの作製, 精製を試みた. ハエ S2 細胞で作製, 精製した E2dTM は単量体の割合が非常に高く, 感染阻害活性を示した. S2 細胞で作製した E2dTM をゲルろ過にて分画しその性状解析を行い, 結晶化を試みる予定である.

[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]

(38) HCV 感染, 粒子形成における E1, E2 の糖鎖の役割

HCVpp システムを用いて複合型またはマンノース型の糖鎖を持つ HCVpp を作製し細胞への侵入を比較し両 HCVpp は同様に細胞に侵入することが分かった. 次に個々の N 型糖鎖 (E1: 4ヶ所, E2: 11ヶ所) に注目し, それぞれの糖鎖修飾部位のアミノ酸を置換した NQ 変異型 (アスパラギンをグルタミンに置換) の HCVcc を作製して, その性状を比較した. その結果, E1 で 2ヶ所, E2 で 2ヶ所の NQ 変異型で粒子産生が減少した.

[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]

(39) HCV 生活環における小胞体関連蛋白分解機構の役割

遺伝子ノックダウン, 強制発現実験より, 小胞体関連蛋白分解因子である EDEM1, EDEM2, EDEM3 のうち EDEM1, EDEM3 が HCV 産生の調節に関与することを見出した. 3種類の EDEM とともに HCV E2 及び E2 と相互作用するが, ERAD の下流分子である SEL1 は EDEM1, EDEM3 と結合しうることが示され, ユビキチンリガーゼ複合体への結合性が EDEM 間で異なることが初めて明らかとなった.

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

(40) HCV NS2 と結合する宿主因子のウイルス粒子形成への関与

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を行い, 同定した. これらの宿主因子について, さらに siRNA を用いてその発現をノックダウンさせ, ウイルスの産生に影響する宿主因子を選別した. その結果, ノックダウンにより HCV の増殖が顕著に抑制される宿主因子を見いだした.

[鈴木亮介, 鈴木哲朗, 脇田隆字]

(4 1) 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 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 複製効率が低下した。また、細胞染色によりこれらの蛋白は細胞内で NS3 およびと共局在することから、HCV 複製複合体の ER から Golgi の輸送に関与する可能性が示された。

[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 (神戸大微生物), 村上恭子, 石井孝司, 鈴木哲朗, 脇田隆字]

(4 2) HCV プロテアーゼ阻害剤に対する耐性 HCV の解析

HCV JFH-1 株の持続感染 Huh7 細胞を作製し、HCV プロテアーゼ阻害剤 BILN2061 100nM を HCV 持続感染細胞に添加し 3 ヶ月間継代培養したところ、BILN2061 耐性の HCV が出現した。HCV 遺伝子配列を解析した結果、NS3 領域に 2 カ所のアミノ酸置換変異 (V71A, K122R) が見出された。変異ウイルスを用いた解析から、BILN2061 に対する抵抗性獲得には V71A, K122R とも重要であり、両変異が存在する場合最も強い抵抗性を示すことが明らかとなった。

[Su Su Hmwe, 伊達朋子, 朝長充則, 鈴木哲朗, 脇田隆字]

(4 3) HCV-NS5A 蛋白に結合し HCV 産生に関与する宿主因子の同定

NS5A 発現細胞から pull-down 法により NS5A に結合する膜蛋白を精製し、プロテオーム解析を施行した。同定された約 25 種のヒト蛋白について HCV レプリコン細胞および HCV 感染細胞を用いて siRNA screening を行い、HCV の翻訳・複製あるいは粒子形成に関与する NS5A 結合蛋白を同定・解析中である。

[後藤耕司, 相崎英樹, 山越 智 (生物活性物質部),

小池和彦 (東大消化器内科), 鈴木哲朗, 脇田隆字]

(4 4) HCV NS5A 蛋白と Prohibitin 2 の相互作用及び HCV 複製に及ぼす影響の解析

NS5A に結合する宿主蛋白質である Prohibitin 2 は、siRNA を用いた遺伝子ノックダウンにより、遺伝子型 1b 及び 2a の HCV において 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、HCV 複製複合体分画に存在し、NS5A との相互作用には NS5A の N 末端側領域が重要であることが示された。

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

(4 5) HCV 粒子形成に関与する脂肪滴周辺膜蛋白の同定と機能解析

脂肪滴周辺膜のプロテオーム解析を行い、45 種類の蛋白を同定し、siRNA によるスクリーニングで、HCV 粒子形成に関与する生体膜蛋白として HSD11 を見出した。野生型 HSD11 の発現に伴い培養上清のウイルス量は増加し、脂肪滴局在シグナル欠損型 HSD11 発現ではウイルス量は減少した。得られた宿主因子に関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, 松本喜弘, 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]

(4 6) HCV 感染が宿主細胞の脂質代謝に与える影響
生体での脂質輸送の中心を担い、HCV 粒子形成、細胞内輸送にも関与することが知られるリポ蛋白の産生、分泌レベルが HCV の感染増殖によって変動するかを解析した。JFH-1, J6/JFH-1 ウイルスを Huh7 細胞に感染させると、いずれの場合にもウイルス増殖に伴い、培養上清中のリポ蛋白は、超低比重リポ蛋白 VLDL が増加し、低比重リポ蛋白 LDL, 高比重リポ蛋白 HDL が低下することを見出した。今後、リポ蛋白に影響を与えるウイルス因子の同定およびその変化のメカニズム

を解析する。

[相崎英樹, 松本喜弘, 後藤耕司, 山本真民, 鈴木哲朗, 脇田隆字]

(47) HCV 感染における HCV 粒子表面脂質の役割

HCV 粒子表面のコレステロールはウイルス感染に重要である。そこで、HCV 粒子形成、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、コレステロール類縁体を用いて構造-感染性相関を解析した。3位の OH 基とアシル側鎖構造が感染性、粒子密度の維持に重要であること、コレステロールの環状構造の柔軟性が感染性を変化させることを確認した。ステロール環状骨格の柔軟性を低下させることによって、細胞表面への HCV 吸着は影響を受けないが、細胞内への侵入効率が低下することが見出された。

[山本真民, 相崎英樹, 鈴木哲朗, 脇田隆字]

(48) HCV trans-packaging 型粒子を用いた感染機構の解析

core-NS2 発現プラスミドおよびルシフェラーゼ発現レプリコンプラスミドを Huh-7 細胞へ導入する事により、trans-packaging 型 HCV 感染性粒子(HCVtcp)を産生させた。これらの粒子およびレトロウイルスによる HCV エンベロープ蛋白を被ったシュードウイルス(HCVpp)を用い、薬剤および抗体による感染阻害効果について解析した。HCVtcp と HCVpp では、抗体による感染中和において感受性が異なる事から、粒子構造や感染機構が異なる可能性が示唆された。

[鈴木亮介, 赤澤大輔, 石井孝司, 鈴木哲朗, 脇田隆字]

(49) Radial-flow bioreactor(RFB)を用いた、3次元高密度培養法による HCV 感染機構の解析

RFB はヒト肝癌細胞株を 3 次元高密度培養できる装置である。このシステムを用いてヒト肝癌由来細胞株(FLC-4)に HCV-2a 株(JFH-1 株)の感染実験を行った。JFH-1 を MOI 0.1 で感染させ、上清中の HCV-RNA を RT-PCR で測定したところ、感染後 20 日より上清中

HCVRNA の増加を認めた。宿主因子とウイルス因子どちらか、または双方の変化が増加の要因と考えられ、現在解析を進めている。

[松本喜弘, 相崎英樹, 松浦知和(慈恵医大病院中央検査部), 脇田隆字]

(50) 血液製剤における HCV の不活化の検討

血液製剤の 60℃液状加熱, 8 或いは 20%エタノール処理による HCV の不活化を評価するため、HCV(JFH-1)をアルブミン製剤に加え、各処理による各反応時間の感染価を調べた結果、1 時間の液状加熱, 或いはエタノール処理で HCV は少なくとも 10^3 感染価が低下した。HCV のモデルウイルス BVDV では、液状加熱では HCV と同様の感染価の低下だったが、エタノール処理では反応 2 時間でも殆ど感染価は低下しなかった。より安全な血液製剤を確保するため不活化法に対するモデルウイルスとの違いを明らかにして行く。

[下池貴志, 野島清子(血液・安全性研究部), 脇田隆字, 岡田義昭(血液・安全性研究部)]

(51) HCV 放出を変化させる低分子化合物スクリーニング

培養液中に放出される感染性 HCV 粒子を測定することにより、これを変化させる低分子化合物のスクリーニングをおこなった。現在さらに大規模な低分子化合物ライブラリーを用いてスクリーニングをおこなっている。

[渡士幸一, 内田奈々子, 脇田隆字]

(52) miRNA による HCV 複製制御の解析

miR-122 を過剰発現することにより見られる HCV 複製レベルの上昇は argonaute 2 (AGO2) のノックダウンにより減少した。また、これまでに同定した miRNA 経路阻害剤は、miR-122 と argonaute 2 (AGO2) との相互作用を低下させ、これに伴って HCV 複製を減弱させた。以上より、AGO2 が HCV 複製に関与していること、またこの関与を阻害することで HCV 複製を抑制できることが示唆された。

[渡士幸一, 下遠野邦忠(千葉工業大), Kuan-Teh Jeang
(National Institutes of Health, USA), 脇田隆
字]

(53) HCV RNA を複製する肝星細胞株の樹立とその
性状解析

肝臓組織中で細胞外マトリクス産生を調節する肝星
細胞を用いてレプリコン細胞を樹立した。複数のクロ
ーンについて細胞外マトリクス調節に関連する遺伝子
の発現量を TaqMan PCR で解析した。その結果、レプ
リコン細胞では collagen 遺伝子が減少し, MMP 遺伝子
は増加していた。また, 肝がん細胞株 Huh-7 を用いて
同様の解析を行ったところ, collagen 遺伝子, MMP 遺
伝子, TIMP1 遺伝子とも増加していた。宿主細胞腫に
よって, HCV RNA 複製に伴う細胞外マトリクス調節関
連遺伝子の発現変動が異なる可能性が示された。

[渡邊則幸, 相崎英樹, 鈴木哲朗, 脇田隆字]

(54) 糖鎖固定化セファロースを用いた HCV と糖鎖
の相互作用の解析

HCV 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。NHS-activated Sepharose に各種シアル酸を含
む合成糖鎖(LacNAc, Sia2-3LacNAc, Sia2-6LacNAc,
Sia2-6(Sia2-3)LacNAc, Sia2-3Lex, Sia2-6Lex) また
は Heparin を固定化し, HCV との結合性を解析した。
その結果, Heparin では約 80% の HCV が吸着され, そ
の他の糖鎖はそれぞれ 20-50% 程度の HCV を吸着した。

[松田麻未, 清水弘樹(産総研北海道), 鈴木哲朗, 脇
田隆字]

(55) 血液中 HCV と硫酸多糖類との結合様式の解析

HCV の宿主肝臓細胞への感染は, 細胞表面に存在す
る硫酸化多糖への接着から開始されると考えられる。
ヘパリン固定化ビーズを使って種々の HCV 陽性血漿検
体の吸着効率を解析したところ, 80% 以上吸着する検
体が存在する半面, 血漿中 HCV の 50% 以下しか吸着さ
れないものも存在した。硫酸化多糖との結合にウイル

ス粒子と共存する抗体, 脂質成分などが影響する可能
性が考えられた。

[高橋由佳, 一色綾子, 鈴木哲朗, 脇田隆字]

(56) HCV 複製細胞における ATP レベルの解析

生細胞内の ATP レベルを, FRET 技術を利用し可視化
するプローブ(ATeam)を用い, HCV 複製細胞における
ATP ダイナミクスを解析した。肝癌由来細胞株 Huh7 細
胞と比較して, HCV レプリコン細胞では
genotype1b, 2a 共に細胞質における ATP レベルが低下
していた。一方, NS5A の C 末側に ATeam を融合した
JFH-1 サブゲノミックレプリコン発現系を構築し, 複
製複合体における ATP レベルを解析したところ, 複製
複合体における ATP レベルが亢進していた。

[安東友美, 今村博臣(大阪大), 鈴木亮介, 相崎英樹,
鈴木哲朗, 脇田隆字]

(57) HCV ゲノム RNA パッケージングシグナル候補
部位の同定

HCV 粒子内に含まれる RNA の大規模網羅的シーケン
ス解析を行ったところ, 全長のゲノム RNA が高率に
存在することが示唆された。一方, HCV ゲノム RNA に
マッピングされない RNA 群を解析したところ, 3' UTR
の末端周辺と同一の配列を含む RNA が高率に検出され
た。そこで, 3' UTR 配列に対してランダムな変異を導入し
感染性ウイルス産生高率に及ぼす影響を解析した
ところ, 二次構造予測で 3' UTR の構造を大きく変化
させうる 1 塩基の変異を同定した。

[安東友美, 鈴木亮介, 鈴木哲朗, 脇田隆字]

(58) 肝炎情報の収集とデータベース構築及び情報
発信

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
炎診療に関する情報収集, および情報提供システムの
構築を行い, 情報の発信を目指している。国は新しい
「肝炎対策基本法案」において, 地域に関わらない予
防策の推進, 適切な医療が受けられるように目指して

いる。そのためには、これらをすばやく正確に伝え、その理解に必要なC型肝炎という病気についての情報をわかり易く発信する重要性が更に高まってきている。我々は急性肝炎、慢性肝炎の疫学、基礎研究の情報を中心に、情報を発信している。

[相崎英樹, 田中純子 (広島大), 脇田隆字]

(59) JFH-2.1株を用いた培養細胞適合HCV培養系の構築

J6/JFH-2.1株を培養細胞に適合させたウイルス株を樹立し、感染とウイルス分離を繰り返した。最終的に得られたウイルス株のウイルスゲノム配列を決定し、適合変異を同定した。

[伊達朋子, 高橋 仁 (インフルエンザウイルス研究センター), 赤澤大輔 (東レ医薬研), 加賀美奈子, 鈴木哲朗, 加藤孝宣, 脇田隆字]

(60) 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、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。

[森山正樹, 赤澤大輔, 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]

(61) 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、E2蛋白質に特異的に反応するモノクローナル抗体を樹立した。

[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]

(62) 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し、抗ウイルス効果を有する化合物を同定した。今後化合物の標的を探索していく。

[朝長充則, 伊達朋子, 鈴木哲朗, 脇田隆字]

(63) 肝炎ウイルス研究データベースの構築

肝炎研究基盤整備事業において肝炎研究を推進するための研究データベースを構築した。文献情報をPnbMedから取り込み、薬剤耐性変異情報などを集積する。

[加藤孝宣, 新井 理 (BITS 三島研究所), 鈴木哲朗, 脇田隆字]

4. E型肝炎ウイルス(HEV)に関する研究

(1) イムノクロマト法による抗HEV抗体の簡易測定

組換えバキュロウイルスを用いて作製したE型肝炎ウイルス様中空粒子を用いて、より簡便なイムノクロマトによる抗HEV-IgG, IgMヒト抗体の測定法を構築し、有用性をELISAと比較した。抗ヒトHEV-IgG抗体の測定では、ELISA陽性20件のうち9件はイムノクロマト法で陽性となり、11件は陰性となった。ELISA陰性30件はイムノクロマト法でも全て陰性となった。抗ヒトHEV-IgM抗体の測定では、ELISA陽性3件は全てイムノクロマト法で陽性となり、ELISA陰性30件はイムノクロマト法でも全て陰性となった。E型肝炎ウイルス様中空粒子を用いたイムノクロマト法で抗HEV-IgG, IgMヒト抗体の簡易測定が可能となった。

[*落合 晋, *石古博昭, 李 天成, 武田直和 (*三菱化学メディエンス)]

(2) 培養細胞における HEV の増殖

G3 HEV を PLC/PRF/5 細胞に接種した後、細胞を継代せず、3 日ごとに培地の更新によって細胞を維持したところ、HEV を接種した直後から細胞培養上清中に RNA が検出され経時的に増加した。接種 4 週後の培養上清中からウイルス構造蛋白が検出され、6 週間後にピークに到達し、その後高いレベルを維持した。間接蛍光免疫染色法により構造蛋白は細胞質に分布することが判明した。濃縮した培養上清中には電子顕微鏡で直径 35nm のウイルス粒子が観察された。PLC/PRF/5 細胞で増幅したウイルスをカニクイザルに静脈接種するとウイルスがサル体内で増幅することが確認され、増幅したウイルスが感染性も持つことも明らかになった。

[李 天成, 恒光 裕 (動物衛生研究所), 宮村達男, 脇田隆宇, 武田直和]

(3) HEV の感染性 cDNA の構築

上記の G3 HEV (83-2 株) の配列に基づき全長 cDNA を構築し、T7 プロモーターを用いて全長 RNA を合成して PLC/PRF/5 細胞にトランスフェクションし、構築したクローンが感染性かどうかの検討を行った。合成した全長 RNA をトランスフェクションした細胞の培養上清中に多量の HEV 抗原が分泌された。また、この培養上清をさらに naive な PLC/PRF/5 細胞に接種すると HEV 抗原の分泌が観察されたことから、培養上清中に感染性の HEV が存在することが確認でき、構築した cDNA が感染性クローンであることが証明された。

[石井孝司, 吉崎佐矢香, 杉山奈央, 加藤孝宣, 李 天成, 武田直和, 脇田隆宇]

(4) 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 を種々の条件で処理した後、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。65°C, 5 分間加熱処理によって HEV は失活した。ウイ

ルスを失活させる塩素 (NaClO) の有効濃度は 125ppm であった。また、紫外線強度 50μW, 30 分間照射によってもウイルスは完全に失活した。HEV はアルコール、クロロホルムに抵抗性を示した。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, 吉崎佐矢香, 石井孝司, 武田直和, 宮村達男, 脇田隆宇]

(5) HEV の感染性を規定する宿主側因子の探索

PLC/PRF/5 の single cell cloning を行い、感染増殖が可能な細胞株と不可能な細胞株を取得してそれぞれについて性状解析を行い、HEV の感染を規定する宿主側因子の探索を試みた。PLC/PRF/5 の single cell cloning を行い、約 100 株の細胞株を取得した。それぞれの株に 83-2 を接種し、約 2 ヶ月程度の長期培養を行い、培養上清中の HEV 抗原量を測定したところ、一部の細胞株は 2 ヶ月後にも HEV 抗原の分泌が観察されず、HEV が感染増殖できないことが示唆された。しかしながらこれらの細胞株も、感染性の HEV RNA をトランスフェクションすると HEV 抗原が分泌されることから、細胞内でのウイルス増殖能には問題がないことが示唆された。感染性を規定する宿主側の因子について現在探索を行っている。

[石井孝司, 吉崎佐矢香, 李 天成, 武田直和, 脇田隆宇]

(6) HEV 蛋白がインターフェロンシグナル応答に及ぼす作用の解析

HAV や HCV ではインターフェロン (IFN) シグナル応答を阻害するメカニズムが存在すること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-β 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、HAV や HEV を PLC/PRF/5 に感染させ、二本鎖 RNA で刺激して IFN 応答を誘導した。HAV 感染細胞では既報の通りレポーター遺伝子の活性の上昇はほぼ完全に抑制されたが、HEV 感染細胞ではレポーター遺伝子の活性の上昇は抑

制されず、IFN- β のシグナル応答には HEV は影響を及ぼしていないことが明らかとなった。

[石井孝司, 加藤 篤 (ウイルス第三部), 脇田隆宇]

(7) 不活化 E 型肝炎ワクチンの検討

培養細胞で増殖した遺伝子型 G1, G3, G4 の HEV を 65°C, 10 分間熱処理した後, それぞれをウサギとラットに 3 回ずつ大腿筋に接種した。接種後, 経時的に採血して ELISA 法で HEV に対する抗体を測定し, さらに免疫血清の中和活性を測定した。熱処理によって不活化した各遺伝子型の HEV をウサギ, ラットに接種すると血中に抗 HEV IgG 抗体が誘導された。抗体価は 1:1,600~25,600 であり, 遺伝子型間に抗体価の差が多少見られた。これらの抗体は HEV の PLC/PRF/5 細胞への感染を阻止した。この結果は, 不活化 HEV によって誘導された抗体が中和活性を持つことを示唆する。

[李 天成, 方 苓, *網 康至, *須崎百合子, 武田直和, 脇田隆宇 (*動物管理室)]

(8) サルにおける HEV の感染

動物実験モデルとしてよく使われるサルにおける HEV の感染状況を把握するため, 定期検査のため採集したサル血清を用いて HEV 抗体を検査し, サルにおける感染状況を調べた。マカク属サルの 9 コロニー群のサルの血清を 2004 年から 2008 年に採集し, 血清の HEV 特異抗体及び HEV 遺伝子を ELISA 法及び Nested PCR 法で検討した。2004 年に採集した 9 群のサル血清からは HEV 特異抗体はほとんど検出されなかったのに対して, 2005 年に採集したサンプルでは一部のコロニーから IgG 抗体が検出され, 2006 年に採集したサンプルでは全体の抗体保有率は 79% に達した。以上の結果から, HEV は自然環境でもサルに感染することが示唆された。

[*山本 博, **松田淳志, 李 天成, ***鈴木樹理, **石田貴文, 武田直和 (*富山大学生命科学先端研究センター, **東京大学理学系大学院, ***京都大学霊長類研究所)]

(9) E 型肝炎ウイルスに対するウサギの感受性

最近, ウサギ飼育場から HEV が分離され, HEV がウサギに感染することが示唆された。実験レベルで HEV がウサギに感染するかどうかを確認し, 新しい動物モデルを見いだすため, G1, G3, G4 HEV をウサギ静脈内に接種し, 経時的に採血と採便を行なった。血液中のウイルス抗原, 特異抗体, ウイルス遺伝子, ALT/AST を測定し, 便中のウイルス抗原, 抗体, およびウイルス遺伝子を測定しウイルスの感染の有無を評価した。いずれの genotype の HEV もウサギに感染しないことは明らかになった。

[李 天成, *網 康至, *須崎百合子, 脇田隆宇 (*動物管理室)]

IV. 腫瘍ウイルスに関する研究

1. 新規ヒトポリオーマウイルスに関する研究

(1) 新規ヒトポリオーマウイルス MCV と糖脂質との相互作用

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 法及び sucrose floatation assay で解析した結果, 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。昨年, 米国のグループから MCV 抗原と GT1b との結合が報告されたが, 粒子構造をとる MCV-LP では同結合は認められなかった。

[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), 鈴木哲朗, 脇田隆宇]

(2) 糖鎖固定化セファロースを用いたヒトポリオーマウイルスと糖鎖の相互作用の解析

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。ガングリオシド以外の糖鎖への相互作用を解析する為に, 各種シアル酸を含む合成糖鎖を固定化したセファロースを作製し, JC-VLP, MC-VLP との相互作用を解析した。JC-VLP は Sia2-6Lex を除くシアル酸糖鎖全てに結合したが, MC-VLP は Sia2-3LacNAc, Sia2-3Lex

のみに結合した。これは SPR 法による解析と同様の傾向であり大変興味深い。

[松田麻未, 清水弘樹 (産総研北海道), 鈴木哲朗, 脇田隆字]

(3) メルケル細胞ポリオーマウイルス (MCV) 様粒子の作製

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るが, 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, 粒子構造などは明らかにされていない。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。組換えバキュロウイルス感染細胞では予想される分子量 (47 kDa) のMCV VP1蛋白が産生され, 培養上清に放出された。培養上清を塩化セシウム密度勾配遠心法で精製し, 電子顕微鏡観察したところ, 比重1.29~1.32 g/cm³分面に直径約20nmまた50nmの二種類の球形粒子構造が認められた。

[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, 脇田隆字, 鈴木哲朗 (*感染病理部)]

(4) 日本における MCV 抗体保有状況の血清疫学的解析

上記の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。精製VLPをラットに接種し抗MCV抗血清を作製し, 抗原性をヒトポリオーマウイルスBKV, JCVと比較した結果, MCV抗体はBKV, JCVと交差反応しないことが示された。このVLPを用いてMCV抗体検出ELISAを開発し我が国の健常人における抗体保有率を解析したところ, 男女ともに若年層では加齢とともに保有率は上昇し1~5歳: 13%, 6~10歳: 23%, 11~15歳: 38%, 16~20歳: 44%であった。また, 61~65歳の保有率は51%であった。地域差は認められなかった。

[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, 脇田隆字, 鈴木哲朗 (*感染病理部)]

V. その他の研究

(1) ヒトボカウイルス様粒子の作製およびその応用
ヒトボカウイルス (Human Bocavirus; HBoV) はパルボウイルス科の一種で, 小児下気道感染症から検出された新しい直鎖一本鎖DNAウイルスである。さらに最近, 二種類の近縁ウイルス (HBoV2, HBoV3) が腸管感染症から発見された。しかしながら, これらのボカウイルスがどのようなヒト疾患に関連するか, 原因となるかについて未だ十分に解析されていない。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ヒトボカウイルスのウイルス様粒子 (VLP) を作製し, ヒトボカウイルスの血清疫学解析を行った。組換えバキュロウイルス感染細胞では予想される分子量のVP2蛋白が産生され, 培養上清に放出された。培養上清を塩化セシウム密度勾配遠心法で精製し, 電子顕微鏡観察したところ, 比重1.30 g/cm³分面に直径約22nmの球形中空粒子構造が認められた。精製VLPをウサギに接種し抗HBoV-VP2, HBoV2-VP2, HBoV3-VP2抗血清を作製し, 三種類のボカウイルスの抗原性を比較した結果, 異なる抗原性を示すものの, 交叉反応も示された。これらのVLPを用いて抗体検出ELISAを開発し我が国の健常人におけるヒトボカウイルス抗体保有率を解析した。

[李 天成, 方 苓, 王 澤鑿, 宋 士利, 片岡紀代 (*感染病理部), 鈴木哲朗, 脇田隆字]

(2) 日本のブタから分離したブタエンテロウイルス 8 型の解析

我々は培養細胞系を用いてブタの糞便から E 型肝炎ウイルスを分離した際, このウイルスとは全く異なるウイルスを分離した。精製ウイルス粒子の構造蛋白の N 末端アミノ酸配列, 全遺伝子配列からブタエンテロウイルス 8 型 (PEV8) であることが明らかになった。PEV8 は PLC/PRF/5 細胞のみならず Vero, PGMK 細胞でも複製したが, PMK, HeLa および Huh7 細胞では感染が成立しなかった。PEV8 は 60°Cでの 10 分加熱, 75%エタノールでの 30 分処理, 塩素 (濃度が 62ppm 以上) 処理などによって失活したが, 紫外線に対しては抵抗

性を示した.

[李 天成, 方 苓, 片岡紀代 (感染病理部), 宮村 達男, 脇田隆字]

<別> 検査業務

第1室:

検定業務

経口生ポリオウイルスワクチン中間段階

F316 検定

経口生ポリオウイルスワクチン小分け品

Lot50 検定

第2室:

平成 21 年度は 6 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

組換沈降B型肝炎ワクチン (酵母由来) 4件

行政検査

E型肝炎確認検査 4件, 4検体

発表業績一覧

I. 誌上発表

1. 欧文発表

- 1) Yoshida T, Kasuo S, Azegami Y, Uchiyama Y, Satsumabayashi K, Shiraishi T, Katayama K, Wakita T, Takeda N, Oka T. Characterization of sapoviruses detected in gastroenteritis outbreaks and identification of asymptomatic adults with high viral load. *J Clin Virol.* 45(1):67-71. 2009.
- 2) Ootsuka Y, Yamashita Y, Ichikawa T, Kondo R, Oseto M, Katayama K, Takeda N, Oka T. Molecular characterization of sapoviruses

detected in sporadic gastroenteritis cases in 2007 in Ehime Prefecture, Japan. *Jpn J Infect Dis.* 62(3):246-8. 2009.

- 3) Iwakiri A, Ganmyo H, Yamamoto S, Otao K, Mikasa M, Kizoe S, Katayama K, Wakita T, Takeda N, Oka T. Quantitative analysis of fecal sapovirus shedding: identification of nucleotide substitutions in the capsid protein during prolonged excretion. *Arch Virol.* 154(4):689-93. 2009.
- 4) Harada S, Okada M, Yahiro S, Nishimura K, Matsuo S, Miyasaka J, Nakashima R, Shimada Y, Ueno T, Ikezawa S, Shinozaki K, Katayama K, Wakita T, Takeda N, Oka T. Surveillance of pathogens in outpatients with gastroenteritis and characterization of sapovirus strains between 2002 and 2007 in Kumamoto Prefecture, Japan. *J Med Virol.* 81(6):1117-27. 2009.
- 5) Eiji Haramoto, Hiroyuki Katayama, Etsuko Utagawa, Shinichiro Ohgaki. Recovery of human norovirus from water by virus concentration methods. *J Virol Methods,* 2009;160:206-209.
- 6) Oka T, Miyashita K, Katayama K, Wakita T, Takeda N. Distinct genotype and antigenicity among genogroup II sapoviruses. *Microbiol Immunol.* 53(7):417-20, 2009.
- 7) Kitajima M, Oka T, Tohya Y, Katayama H, Takeda N, Katayama K. Development of a broadly reactive nested reverse transcription-PCR assay to detect murine noroviruses, and investigation of the prevalence of murine noroviruses in laboratory mice in Japan. *Microbiol Immunol.* 53(9):531-4. 2009
- 8) Oka T, Yokoyama M, Katayama K, Tsunemitsu H, Yamamoto M, Miyashita K, Ogawa S, Motomura K, Mori H, Nakamura H, Wakita T, Takeda N, Sato

- H. Structural and biological constraints on diversity of regions immediately upstream of cleavage sites in calicivirus precursor proteins. *Virology*. 394(1):119-29. 2009.
- 9) Someya Y, Takeda N: Insights into the Enzyme-Substrate Interaction in the Norovirus 3C-like Protease. *J Biochem* 146: 509-521, 2009.
- 10) Murakami K, Suzuki S, Aoki N, Okajima T, Nadano D, Uchida K, Yamashita K, Oka T, Katayama K, Takeda N, Matsuda T. Binding of Norovirus virus-like particles (VLPs) to human intestinal Caco-2 cells and the suppressive effect of pasteurized bovine colostrum on this VLP binding. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 74(3): 541-547. 2010.
- 11) Zhang Y, Wang H, Zhu S, Li Y, Song L, Liu Y, Liu G, Nishimura Y, Chen L, Yan D, Wang D, An H, Shimizu H, Xu A, Xu W. Characterization of a rare natural intertypic type 2/type 3 penta-recombinant vaccine-derived poliovirus isolated from a child with acute flaccid paralysis. *J Gen Virol* 91: 421-429, 2010.
- 12) Thorley B, Kelly H, Nishimura Y, Yoon YK, Brussen KA, Roberts J, Shimizu H. Oral poliovirus vaccine type 3 from a patient with transverse myelitis is neurovirulent in a transgenic mouse model. *J Clin Virol* 44: 268-271, 2009.
- 13) Nishimura Y, Shimojima M, Tano Y, Miyamura T, Wakita T, Shimizu H. Human P-selectin glycoprotein ligand-1 is a functional receptor for enterovirus 71. *Nat Med* 15: 794-797, 2009.
- 14) Mizuta K, Aoki Y, Suto A, Ootani K, Katsushima N, Itagaki T, Ohmi A, Okamoto M, Nishimura H, Matsuzaki Y, Hongo S, Sugawara K, Shimizu H, Ahiko T. Cross-antigenicity among EV71 strains from different genogroups isolated in Yamagata, Japan, between 1990 and 2007. *Vaccine* 27: 3153-3158, 2009.
- 15) Goto K, Sanefuji M, Kusahara K, Nishimura Y, Shimizu H, Kira R, Torisu H, Hara T. Rhombencephalitis and coxsackievirus A16. *Emerg Infect Dis* 15: 1689-1691, 2009.
- 16) Arita M, Wakita T, Shimizu H. Cellular kinase inhibitors that suppress enterovirus replication have a conserved target in viral protein 3A similar to that of eneviroxime. *J Gen Virol* 90: 1869-1879, 2009.
- 17) Arita M, Ling H, Yan D, Nishimura Y, Yoshida H, Wakita T, Shimizu H. Development of a reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) system for a highly sensitive detection of enterovirus in the stool samples of acute flaccid paralysis cases. *BMC Infect Dis* 9: 208, 2009.
- 18) Saeed M, Suzuki R, Kondo M, Aizaki H, Kato T, Mizuochi T, Wakita T, Watanabe H, Suzuki T: Evaluation of Hepatitis C Virus Core Antigen Assays in Detecting Recombinant Viral Antigens of Various Genotypes. *J Clin Microb* 47: 4141-4143, 2009.
- 19) Hara H, Aizaki H, Matsuda M, Shinkai-Ouchi F, Inoue Y, Murakami K, Shoji I, Kawakami H, Matsuura Y, Lai MMC, Miyamura T, Wakita T, Suzuki T: Involvement of creatine kinase B in hepatitis C virus genome replication through interaction with the viral NS4A protein. *J Virol* 83: 5137-47, 2009.
- 20) Shimoji T, Murakami K, Sugiyama Y, Matsuda M, Inubushi S, Nasu J, Shirakura M, Suzuki T, Wakita T, Kishino T, Hotta H, Miyamura T, Shoji I: Identification of annexin A1 as a novel substrate for E6AP-mediated

- ubiquitylation. *J Cellular Biochemistry*, 106: 1123-1135, 2009.
- 21) Hmwe S, Aizaki H, Date T, Murakami K, Ishii K, Miyamura T, Koike K, Wakita T and Suzuki T: Identification of hepatitis C virus genotype 2a replicon variants with reduced susceptibility to ribavirin. *Antiviral Res* 85: 520-524, 2010.
- 22) Kiyohara T, Totsuka A, Ishii K, Ito T, and Wakita T: Characterization of anti-idiotypic antibodies mimicking the antibody-binding site and the receptor-binding site on hepatitis A virus. *Arch Virol* 154:1263-1269, 2009.
- 23) Kiyohara T, Ouchi Y, Sato T, Yoneyama T, Ishii K, Ito T, and Wakita T: Evaluation of an in-house anti-hepatitis A virus (HAV)-specific immunoglobulin M capture enzyme-linked immunosorbent assay kit and its practical use for analysis of an HAV outbreak. *J Med Virol* 81:1513-6, 2009.
- 24) Masaki T, Suzuki R, Saeed M, Mori K, Matsuda M, Aizaki H, Ishii K, Maki N, Miyamura T, Matsuura M, Wakita T, and Suzuki T: Production of infectious hepatitis C virus by using RNA polymerase I-mediated transcription. *J Virol* 84: 5824-5835, 2009.
- 25) Zhang YY, Zhang BH, Ishii K and Liang TJ. A novel function of CD81 in controlling hepatitis C virus replication. *J Virol*, 84: 3396-3407, 2009.
- 26) Ishii K, Hasegawa H, Nagata N, Ami Y, Fukushi S, Taguchi F, and 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.
- 27) Suzuki R, Moriishi K, Fukuda K, Shirakura M, Ishii K, Shoji I, Miyamura T, Matsuura M, Suzuki T: Proteasomal turnover of hepatitis C virus core protein is regulated by two distinct mechanisms: ubiquitin-dependent and ubiquitin independent but PA28g-dependent. *J Virol* 83: 2389-2392, 2009.
- 28) Yamashita T, Mori Y, Miyazaki N, Cheng RH, Yoshimura M, Unno H, Shima R, Moriishi K, Tsukihara T, Li TC, Takeda N, Miyamura T, Matsuura Y: Biological and immunological characteristics of hepatitis E virus-like particles based on the crystal structure. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 106: 12986-91, 2009.
- 29) Sugitani M, Tamura A, Shimizu YK, Sheikh A, Kinukawa N, Shimizu K, Moriyama M, Komiyama K, Li TC, 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, 2009.
- 30) Sugitani M, Sheikh A, Suzuki K, Kinukawa N, Moriyama M, Arakawa Y, Komiyama K, Li TC, Takeda N, Ishaque SM, Roy PK, Raihan AS, Hasan M: Sero-epidemiology of sporadic acute hepatitis in Bangladesh: high prevalences of infection with type-B, type-E and multiple types of hepatitis virus. *Ann Trop Med Parasitol* 103: 343-50, 2009.
- 31) Hazari S, Chandra PK, Poat B, Datta S, Garry RF, Foster TP, Kousoulas G, Wakita T, Dash S. Impaired antiviral activity of interferon alpha against hepatitis C virus 2a in Huh-7 cells with a defective Jak-Stat pathway. *Virol J*. 7(1): 36, 2010.
- 32) Ishibashi M, Wakita T, Esumi M. 2',5'-Oligoadenylate synthetase-like gene highly induced by hepatitis C virus infection in human liver is inhibitory to viral

- replication in vitro. *Biochem Biophys Res Commun.* 392(3): 397-402, 2010.
- 33) Liu X, Wang T, Wakita T, Yang W. Systematic identification of microRNA and messenger RNA profiles in hepatitis C virus-infected human hepatoma cells. *Virology.* 398(1): 57-67, 2010.
- 34) Angus AG, Dalrymple D, Boulant S, McGivern DR, Clayton RF, Scott MJ, Adair R, Graham S, Owsianka AM, Targett-Adams P, Li K, Wakita T, McLauchlan J, Lemon SM, Patel AH. Requirement of cellular DDX3 for hepatitis C virus replication is unrelated to its interaction with the viral core protein. *J Gen Virol.* 91(1): 122-32, 2010.
- 35) Seronello S, Ito C, Wakita T, Choi J. Ethanol enhances hepatitis C virus replication through lipid metabolism and elevated NADH/NAD⁺. *J Biol Chem.* 285(2): 845-54, 2010.
- 36) Abe K, Ikeda M, Ariumi Y, Dansako H, Wakita T, Kato N. HCV genotype 1b chimeric replicon with NS5B of JFH-1 exhibited resistance to cyclosporine A. *Arch Virol.* 154 (10): 1671-7, 2009.
- 37) Hiraga N, Imamura M, Hatakeyama T, Kitamura S, Mitsui F, Tanaka S, Tsuge M, Takahashi S, Abe H, Maekawa T, Ochi H, Tateno C, Yoshizato K, Wakita T, Chayama K. Absence of viral interference and different susceptibility to interferon between hepatitis B virus and hepatitis C virus in human hepatocyte chimeric mice. *J Hepatol.* 51(6): 1046-54, 2009.
- 38) Kato N, Mori K, Abe KI, Dansako H, Kuroki M, Ariumi Y, Wakita T, Ikeda M. Efficient replication systems for hepatitis C virus using a new human hepatoma cell line. *Virus Res.* 146(1-2): 41-50, 2009.
- 39) Tanida I, Fukasawa M, Ueno T, Kominami E, Wakita T, Hanada K. Knockdown of autophagy-related gene decreases the production of infectious hepatitis C virus particles. *Autophagy.* 5(7): 937-45, 2009.
- 40) Murakami Y, Noguchi K, Yamagoe S, Suzuki T, Wakita T, Fukazawa H. Identification of bisindolylmaleimides and indolocarbazoles as inhibitors of HCV replication by tube-capture-RT-PCR. *Antiviral Res.* 83(2): 112-7, 2009.
- 41) Kang JI, Kim JP, Wakita T, Ahn BY. Cell culture-adaptive mutations in the NS5B gene of hepatitis C virus with delayed replication and reduced cytotoxicity. *Virus Res.* 144(1-2): 107-16, 2009.
- 42) Dansako H, Ikeda M, Ariumi Y, Wakita T, Kato N. Double-stranded RNA-induced interferon-beta and inflammatory cytokine production modulated by hepatitis C virus serine proteases derived from patients with hepatic diseases. *Arch Virol.* 154(5): 801-10, 2009.
- 43) Weng L, Du J, Zhou J, Ding J, Wakita T, Kohara M, Toyoda T. Modification of hepatitis C virus 1b RNA polymerase to make a highly active JFH1-type polymerase by mutation of the thumb domain. *Arch Virol.* 154(5): 765-73, 2009.
- 44) Park CY, Jun HJ, Wakita T, Cheong JH, Hwang SB. Hepatitis C virus nonstructural 4B protein modulates sterol regulatory element-binding protein signaling via the AKT pathway. *J Biol Chem.* 3:284(14): 9237-46, 2009.
2. 和文発表
- 1) 岡智一郎. ノロウイルス, サポウイルス感染症. 「臨床検査」, 53 (6), 665-72, 2009.

- 2) Hara M., Yano K., E. Tajiri-Utagawa. Comparison of Norovirus Genotypes by Real Time PCR (genogroup II) (Real Time PCR 法を用いた Norovirus の GII 遺伝子型別比較). 感染症学雑誌. 83:564-565, 2009.
 - 3) 片山和彦, 岡智一郎, 高木弘隆. ノロウイルス研究の現状とマウスノロウイルス研究の有用性. 日本実験動物協会誌「LABIO21」, No. 39, 20-26, 2010.
 - 4) 片山和彦. ノロウイルス対策. 「高校保健ニュース」, 2009年11月18日号. 株式会社少年写真新聞社.
 - 5) 片山和彦. ノロウイルスについて. 「健康教室」, 2010年1月号 通巻894号 東山書房 p74-79.
 - 6) 片山和彦. ノロウイルス, ロタウイルス. ザ特集最新学校保健安全ハンドブック (書籍) p77-80.
 - 7) 高山直秀, 崎山弘, 清水博之, 宮村達男, 岡部信彦 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積接種率 - 2008年度調査結果-. 小児科臨床 63: 1127-1134, 2010.
 - 8) 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.
 - 9) 西村順裕 清水博之. エンテロウイルス 71 受容体としての P-selectin glycoprotein ligand-1 の同定. ウイルス 2009.
 - 10) 清水博之. WHO Enterovirus Collaborating Center の役割と機能. ウイルス 59: 43-52, 2009.
 - 11) 清水博之. ポリオ (急性灰白髄炎). 診断と治療 97: 83-85, 2009.
 - 12) 清水博之 小林一司. 野生株ポリオウイルスの実験室封じ込め. 病原微生物検出情報 30: 181-182, 2009.
 - 13) 清水博之. ワクチン由来ポリオウイルスによるポリオ流行. 病原微生物検出情報 30: 174-176, 2009.
 - 14) 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.
 - 15) 岩井雅恵, 中村一哉, 小原真弓, 堀元栄詞, 長谷川澄代, 倉田毅, 滝澤剛則 吉田弘. 環境水サーベイランスによるポリオウイルス伝播の監視-富山県. 病原微生物検出情報 30: 180-181, 2009.
 - 16) 多屋馨子, 佐藤 弘, 岡部信彦 清水博之. ポリオ中和抗体保有状況ならびにポリオワクチン接種状況. 病原微生物検出情報 30: 178-180, 2009.
 - 17) 吉田 弘, 和田純子, 有田峰太郎, 西村順裕, 清水博之, 佐藤 弘, 北本理恵, 山本久美, 新井 智, 多屋馨子. 感染源調査によるポリオサーベイランス. 病原微生物検出情報 30: 176-178, 2009.
 - 18) 政木隆博, 鈴木哲朗: HCVの分子生物学. 肝臓. 日本臨床67(3): 134-137, 2009.
 - 19) 清原知子, 石井孝司. 新時代のワクチン戦略について考える『任意接種のワクチン 7. A型肝炎』医学書院. 印刷中
 - 20) 清原知子, 石井孝司. A型肝炎 基礎. 臨床とウイルス 37: 283-290, 2009.
 - 21) 李 天成, 武田直和, 石井孝司. E型肝炎 基礎. 臨床とウイルス 37: 337-344, 2009.
 - 22) 清原知子, 石井孝司. ファクトシート (案) 1. A型肝炎. 食品により媒介される感染症等に関する文献調査報告書: 社団法人 畜産技術協会: 255-259, 2010.
 - 23) 脇田隆宇. HCV培養系. Medical Practice. 27(1): 111-112, 2010.
3. その他
- 1) Country Progress Report on Maintaining Polio-free Status, Japan: WHO report, 2009.
- II. 学会発表
- 国際学会
- 1) Ueki Y., Shoji M., Okimura Y., Masago Y., Miura T., Omura T., Oka T., Katayama K., Takeda N., Noda M., Miyota Y.: Prevalence and

- genotypes of sapovirus in wastewater, oysters and gastroenteritis patients in Japan. 15th International Symposium on Health-Related Water Microbiology. Greece, 2009. 5.
- 2) Kitajima M, Oka T, Katayama K, Takeda N, Haramoto E, Katayama H, and Ohgaki S: Seasonal distribution and genetic diversity of noroviruses, sapoviruses, and Aichi viruses in river water in Japan. *ibid.*
- 3) Kitajima M, Oka T, Katayama K, Takeda N, Haramoto E, Katayama H, and Ohgaki S: Genetic diversity of noroviruses and sapoviruses in river water in Japan. 109th General Meeting of American Society for Microbiology. Q-403. Philadelphia, Pennsylvania, USA, 2009. 5.
- 4) Nishimura Y, Shimojima M, Tano Y, Miyamura T, Wakita T, Shimizu H: Human P-selectin glycoprotein ligand-1 is a functional receptor for enterovirus 71. Gordon Research Conference on Viruses & Cells, イタリア, 2009. 6. 7-12.
- 5) Arita M Shimizu H: Evaluation of real-time PCR assays for ITD and VDPV screening at NIID. The 15th Informal Consultation on the Global Polio Laboratory Network, スイス, 2009. 6. 23-25.
- 6) Shimizu H: Identification of Specific Cellular Receptors for Enterovirus 71. in APEC Conference for Surveillance, Treatment, Laboratory Diagnosis and Vaccine Development of Enteroviruses, 台湾, 2009. 8. 13-14.
- 7) Akari H, Iwasaki Y, Mori K, Maki N, Ishii K, Iijima S, Yoshida T, Yoshizaki S, Suzuki T, and Miyamura T. Characterization of chronic GBV-B infection in marmosets: selective and frequent nonsynonymous mutations of the viral genome. 9th Awaji International Forum on Infection and Immunity, Awaji, Japan, 2009. 9. 8-11.
- 8) Oka T: Molecular Epidemiology of Sapovirus in Japan. The Sixth Japan-Taiwan Symposium on 2009 Influenza Pandemic and Enteric Virus Infection and New development for Rapid Diagnosis. 東京, 2009. 9. 10-11
- 9) Shimizu H: Identification of distinct cellular receptors for enterovirus 71. *ibid.*
- 10) Nishimura Y: Human P-selectin glycoprotein ligand-1 is a functional receptor for enterovirus 71. *ibid.*
- 11) Masaki T, Matsunaga S, Takahashi H, Kato T, Miyamura T, Endo Y, Sawasaki T, Wakita T, Suzuki T: Identification of novel serine/threonine protein kinases responsible for HCV NS5A phosphorylation. 16th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Nice, France, 2009. 10. 3-7.
- 12) Asako Murayama, Leiyun Weng, Tomoko Date, Daisuke Akazawa, Tetsuro Suzuki, Takanobu Kato, Tetsuya Toyoda and Takaji Wakita: Specific RNA structures and mutations implicated for HCV RNA replication and virus particle formation in cultured cells. *ibid.*
- 13) Mohsan Saeed, Takanobu Kato, Youkyung Choi, Krzyztof Krawczynski, Jake Liang, Takaji Wakita: In vitro behavior of hepatitis C virus JFH-1 strains with mutations emerged after passage in chimpanzees. *ibid.*
- 14) Youkyung Choi, Takanobu Kato, Takaji Wakita, Jake Liang, Krzyztof Krawczynski: Dynamic profile of gene expression in the liver during hepatitis C virus (HCV) JFH1 infection in chimpanzees. *ibid.*
- 15) Moriishi K, Shoji I, Suzuki R, Suzuki T, Matsuura Y: Involvement of PA28gamma and E6AP

- in the degradation of HCV core protein and the viral production. *ibid.*
- 16) Shoji I, Abe K, Murakami K, Ishii K, Suzuki T, Wakita T, Miyamura T, Koike K, Hotta H: The hnRNP H1 modulates production of HCV particles through interaction with HCV core protein. *ibid.*
- 17) Suzuki R, Saito K, Ando T, Ishii K, Matsuura Y, Miyamura T, Wakita T, Tetsuro Suzuki: Plasmid-based production of trans-complemented HCV particles: its use for functional analysis of NS2. *ibid.*
- 18) Yamamoto M, Aizaki H, Goto K, Hamano K, Miyamura T, Wakita T, Suzuki T: Structural requirement of virion-associated cholesterol for HCV morphogenesis and infectivity. *ibid.*
- 19) Watanabe N, Aizaki H, Matsuura T, Wakita T, Suzuki T: HCV subgenomic replicon replication in human hepatic stellate cell lines. *ibid.*
- 20) Yoshida T, Iwasaki Y, Mori K, Maki N, Ishii K, Iijima S, Yoshizaki S, Katakai Y, Suzuki T, Miyamura T, and Akari H. Selective and frequent non-synonymous mutations of the viral genome in chronically GBV-B-infected marmosets. *ibid.*
- 21) Moriyama M, Akazawa D, Omi N, Shibuya Y, Nishimura K, Nakamura N, Mochizuki H, Suzuki T, Ishii K, and Wakita T. Vaccination of infectious HCV particles with several adjuvants and induction of neutralization immunoglobulin in mice. *ibid.*
- 22) Ariumi Y, Kuroki M, Maki M, Ikeda M, Dansako H, Wakita T, Kato N: the secret pathway is required for HCV production. *ibid.*
- 23) Carpentier A, Podevin P, Pene V, Aoudjehane L, Carriere M, Zaidi S, Hernandez C, Meritet JF, Scatton O, Dreux M, Cosset F, Bartenschlager R, Wakita T, Conti F, Calmus Y, Rosenberg AR: HCV grown in primary human hepatocytes has higher specific infectivity and lower buoyant density than HCV grown in huh-7 cell line. 16th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. *ibid.*
- 24) Machida K, Llu L, Duan L, Kondo Y, Fong S, Wakita T, Ou JH, Lai M: Lymphtropism of hepatitis C virus is genetically determined with identification of immune cell-specific binding factor. *ibid.*
- 25) Kuroki M, Ariumi Y, Ikeda M, Dansako H, Wakita T, Kato N: The PML tumor suppressor protein is required for HCV production. *ibid.*
- 26) Saulnier A, Groult G, Ghibaudo D, Wakita T, Cohen L, Marnata C, Martin A: Analysis of particle assembly from chimeric HCV JFH-1 genomes expressing E1-E2-p13 of GB virus B. *ibid.*
- 27) Arnaud N, Dabo S, Maillard P, Budkowska A, Garcin D, Gatignol A, Wakita T, Meurs E: HCV induces IFN at the early steps of infection. *ibid.*
- 28) Choi Y, Kato T, Wakita T, Liang TJ, Krawczynski K: Dynamic profile of gene expression in the liver during hepatitis C virus (HCV) JFH1 infection in chimpanzees. *ibid.*
- 29) Kawai Y, Ikeda M, Yano M, Abe KI, Nishimura G, Dansako H, Ariumi Y, Wakita T, Yamamoto K, Kato N: Anti-ulcer agent, teprenone, enhanced statin's anti-HCV activity by augmenting the inhibition of geranylgeranylation. *ibid.*
- 30) Angus AG, Dalrymple D, Boulant S, Mcgovern D, Adair R, Owsianka AM, Targett-Adam P, Wakita T, McLauchlan J, Lemon SM, Patel AH: The requirement of DDX3 for HCV replication is

- unrelated to its interaction with the viral core protein. *ibid.*
- 31) Seronello S, Ito C, Wakita T, Choi J: Ethanol enhances hepatitis C virus replication through acetaldehyde, NADH/NAD⁺, and host lipid metabolism. *ibid.*
- 32) Murayama A, Date T, Akazawa D, Kato T, Suzuki T, Wakita T: Specific RNA structures and mutations implicated for HCV RNA replication and virus particle formation in cultured cells. The Liver Meeting 2009, AASLD's 60th Annual Meeting, Boston, MA, 2009.10.30-11.3.
- 33) Shimizu H: Genetic and Phenotypic Diversities of Enterovirus 71 in the Asia-Pacific Region, The Third Japan-China-Korea Forum on Communicable Disease Control and Prevention, Tokyo, 2009.11.24.
- 34) Shimoike T, McKenna SA, Lindhout DA, Wakita T, Puglisi JD: The HCV IRES is a potent activator of PKR but resistant to eIF2 phosphorylation, 第49回アメリカ細胞生物学会年会, アメリカ, 2009.12.5-9.
- 35) Shimizu H: Laboratory Diagnosis of Enterovirus 71 Infection, Informal Consultation Meeting for Hand Foot Mouth Disease, マレーシア. 2010.3.10-12.
- 36) Li TC: Challenges in creating a vaccine to prevent hepatitis E. The 3rd China-Japan Science Forum, Wuhan, China, 2010.3.15-16.
- 37) Li TC and Miyamura T: Vaccines for hepatitis E. The 20th conference of the APASL. Beijing, China, 2010.3.25-28.
- 38) Wakita T: HCV cell culture system. Asian Pacific Digestive Week (APDW2009) Taipei, Taiwan, 2009.9.29.
- 39) Wakita T: HCV cell culture system and antiviral development. International Symposium on Hepatocellular Carcinoma, Kagoshima University Faculty of Medicine, Kagoshima, Japan, 2010.2.19.
- 40) Wakita T: HCV replication and virus particle formation in cell culture. International Symposium for Information Exchange in Bio Industry, Inflammation and Cancer: International Symposium on Current Insight into Prevalent Diseases, POSTECH Biotech Center, Pohang, Korea, 2010.2.22.
2. 国内学会
- 1) 片山和彦: 今, 問題の食中毒. 日本獣医公衆衛生学会シンポジウム, 宮崎市, 2009.1.
- 2) 片山和彦: ノロウイルス研究の現状とマウスノロウイルスのノロウイルス研究への有用性. 第147回日本日本獣医学会学術集会, 日本実験動物医学会シンポジウム, 宇都宮, 2009.4.2.
- 3) 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, 片貝祐子, 鈴木哲朗, 神奈木真理, 宮村達男, 明里宏文: マーモセットを用いた C 型肝炎サロゲートモデルの開発. 第56回実験動物学会総会, 大宮, 2009.5.
- 4) 李 天成, 宮村達男, 武田直和, 脇田隆字: 培養細胞における E 型肝炎ウイルス (HEV) の増殖. 第16回肝細胞研究会, 高知, 2009.6.
- 5) 鈴木亮介, 石井孝司, 松浦善治, 宮村達男, 脇田隆字, 鈴木哲朗: プラスミドトランスフェクションによる C 型肝炎ウイルスの trans-packaging システムの確立: フラビウイルスとの相違点について. 第44回日本脳炎ウイルス生態学研究会, 北海道, 2009.6.
- 6) 加藤孝宣, 伊達朋子, 脇田隆字: C型肝炎ウイルスの生体内での感染様式と培養細胞での増殖能. 第45回日本肝臓学会総会, 神戸, 2009.6.4-5.
- 7) 村山麻子, 加藤孝宣, 脇田隆字: C型肝炎ウイルスの複製増殖に関与するウイルス遺伝子領域の検討. 同上.
- 8) 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, 片貝祐子, 鈴木哲朗, 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.
- 9) 三島果子, 坂本直哉, 箴島裕子, 中川美奈, 田坂めぐみ, 櫻井 幸, 須田剛生, 小貫優子, 山本満千, 渡辺貴子, 船岡祐介, 井津井康浩, 陳正新, 脇田隆字, 渡辺 守: 細胞障害性 HCV-JFH1 subclone の単離と機能解析. ワークショップ3 「C型肝炎の基礎と臨床」, 同上.
- 10) 脇田隆字: 肝炎ウイルス基礎研究. ハイライトレクチャー, 同上.
- 11) 李 天成, 落合 晋, 石古博昭, 脇田隆字: 輸入感染 E 型肝炎ウイルスの解析. 同上.
- 12) 落合 晋, 石古博昭, 李 天成: イムノクロマト法による抗 Hepatitis E Virus (HEV) の抗体簡易測定. 同上.
- 13) 野田絵理, 甘利昭一郎, 生田陽二, 小田新, 石川涼子, 野田雅裕, 内山健太郎, 滝有希子, 大場邦弘, 成井研治, 住田朋子, 石井ちぐさ, 河野寿夫, 水谷哲也, 清水博之, 片野晴隆: パレコウイルス 3 型感染による新生児脳症の 1 例. 第 45 回日本周産期・新生児医学会学術集, 名古屋, 2009. 7. 12-14.
- 14) 熊谷安希子, 久保田智巳, 伊藤浩美, 成松 久, 脇田隆字, 石井孝司, 染谷雄一, 白土東子: X 線結晶構造解析によるノロウイルスと血液型抗原の結合解析. 第 29 回日本糖質学会, 高山, 2009. 9.
- 15) 有田峰太郎: Characterization of cellular kinase inhibitors that suppress poliovirus and enterovirus 71 replication. 第 25 回内藤コンファレンス “Chemical Biology [II]”, 札幌 2009. 9. 9.
- 16) 内藤誠之郎, 片岡紀代, 清原知子, 落合雅樹, 前山順一, 倉永雅彦, 千北一興, 高田寛治: 溶解生マイクロニードルアレイを利用した経皮ワクチンの試み. 第 13 回日本ワクチン学会, 札幌, 2009. 9.
- 17) 本村和嗣, 横山 勝, 大出裕高, 中村浩美, 守宏美, 岡智一郎, 片山和彦, 神田忠仁, 田中智之, 武田直和, 佐藤裕徳: ノロウイルス GII/4 ゲノムとキャプシド構造の自然界での進化. 第 57 回日本ウイルス学会学術集会, 東京, 2009. 10.
- 18) 中西 章, Benoit Chapellier, 片山和彦, 岡智一郎, 武田直和: ノロウイルスを利用した経口ワクチン用ベクター作成の試み. 同上.
- 19) 片山和彦, 岡智一郎, 脇田隆字: ノロウイルスリバーシジェネティックシステムのノロウイルスプロテアーゼを利用した制御. 同上.
- 20) 岡智一郎, 高木弘隆, 遠矢幸伸, 武田直和, 脇田隆字, 片山和彦: カリシウイルス増殖阻害物質スクリーニング系の構築. 同上.
- 21) 北島正章, 岡智一郎, 原本英司, 片山浩之, 大垣眞一郎, 武田直和, 片山和彦: 多摩川河川水からのサポウイルスの検出および遺伝子解析. 同上.
- 22) 片山和彦, 岡智一郎, 高木弘隆, 遠矢幸伸, 脇田隆字: マウスノロウイルスの複製機構の解析. 同上.
- 23) 横山 勝, 岡智一郎, 片山和彦, 遠矢幸伸, 神田忠仁, 武田直和, 佐藤裕徳: マウスとヒトのノロウイルスの酵素の構造類似性. 同上.
- 24) 高木弘隆, 遠矢幸伸, 片山和彦, 岡智一郎, 杉山和良: マウスノロウイルス (MNV) のエタノール感受性と粒子, 遺伝子への影響について検討. 同上.
- 25) 原 正幸, 高橋邦明, 柴田伸一郎, 小平彩里, 矢野一好, 宇田川悦子: HRM 分析を用いたノロウイルス診断法の開発 (Genogroup II). 同上.
- 26) 熊谷安希子, 久保田智巳, 伊藤浩美, 成松 久, 石井孝司, 染谷雄一, 脇田隆字, 白土東子: X 線結晶構造解析によるノロウイルスと血液型抗原の結合解析. 同上.
- 27) 染谷雄一, 白土東子, 武田直和, 脇田隆字: ノロウイルス様中空粒子の大きさに影響を及ぼす

- アミノ酸残基置換. 同上.
- 28) 齋藤博之, 東方美保, 白土東子, 田中智之, 野田 衛: パンソルビン・トラップ法により汚染食品から濃縮回収したノロウイルスの遺伝子検出条件の検討. 同上.
- 29) 東方美保, 齋藤博之, 白土東子, 田中智之, 野田 衛: 食品検体のノロウイルス検査に向けたパンソルビン・トラップ法の実用化の検討. 同上.
- 30) 李 天成, 宮村達男, 武田直和, 脇田隆宇: 培養細胞を用いた E 型肝炎ウイルスの安定性の検討. 同上.
- 31) 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: 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. 同上.
- 32) 落合 晋, 石古博昭, 李 天成: イムノクロマト法による抗 Hepatitis E virus 抗体の測定. 同上.
- 33) 山本 博, 松田淳志, 李 天成, 鈴木樹理, 石田貴文, 武田直和: サルにおける E 型肝炎ウイルスの感染. 同上.
- 34) 三好龍也, 内野清子, 李 天成, 武田直和, 北本憲利, 田中智之: 野生イノシシの E 型肝炎ウイルス保有状況調査. 同上.
- 35) 赤澤大輔, 森山正樹, 尾見法昭, 中村紀子, 鈴木哲朗, 石井孝司, 脇田隆宇: 培養細胞由来 HCV 粒子ワクチンの免疫による異なる遺伝子型 HCV 感染阻害活性の誘導. 同上.
- 36) 森山正樹, 赤澤大輔, 尾見法昭, 中村紀子, 鈴木哲朗, 石井孝司, 脇田隆宇: 培養細胞由来 HCV 粒子を用いたワクチンの免疫誘導能および最適アジュバントの検討. 同上.
- 37) 勝二郁夫, 阿部克俊, 村上恭子, 石井孝司, 鈴木哲朗, 脇田隆宇, 宮村達男, 小池和彦, 堀田博: C 型肝炎ウイルス増殖における宿主因子 hnRNP H1/H2/F の役割. 同上.
- 38) 鈴木亮介, 齋藤憲司, 安東友美, 石井孝司, 松浦善治, 宮村達男, 脇田隆宇, 鈴木哲朗: C 型肝炎ウイルスの *trans*-packaging 系を用いた NS2 蛋白質の感染性粒子形成における機能解析. 同上.
- 39) 大西和夫, 清原知子, 石井孝司, 小林和夫: HAV 特異的モノクローナル抗体を用いた ELISA 検出系の最適化と HAV 抗体産生 B 細胞動態解析法の検討. 同上.
- 40) 西村順裕, 宮村達男, 脇田隆宇, 清水博之: エンテロウイルス 71 と PSGL-1 受容体との結合には PSGL-1 アミノ末端領域のチロシン硫酸化が重要である. 同上.
- 41) 有田峰太郎, 脇田隆宇, 清水博之: 細胞のキナーゼ阻害剤の持つエンテロウイルス複製阻害機構に関する解析. 同上.
- 42) 有田峰太郎, 脇田隆宇, 清水博之: RT-LAMP 法による便検体からのエンテロウイルスの直接検出. 同上.
- 43) 宮村紘平, 西村順裕, 安保雅博, 脇田隆宇, 清水博之: 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 増殖とウイルス遺伝子変異の解析. 同上.
- 44) 吾郷昌信, 平野 学, 山口顕徳, 吉川 亮, Umami Rifqiyar Nur 西村順裕, 清水博之: 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同定法. 同上.
- 45) 町田早苗, 岩井雅恵, 西村順裕, 滝澤剛則, 清水博之: 環境水中からのヒトパレコウイルス (HPeV) 検出と地域流行の関連. 同上.
- 46) 清水博之: 世界ポリオ根絶計画とポリオウイルス研究. 同上.
- 47) 政木隆博, 松永智子, 高橋宏隆, 加藤孝宣, 宮村達男, 遠藤弥重太, 澤崎達也, 脇田隆宇, 鈴木哲朗: HCV NS5A 蛋白質のリン酸化に関与する新規セリン/スレオニンプロテインキナーゼの探索. 同上.
- 48) 村山麻子, 伊達朋子, 赤澤大輔, 加藤孝宣, 鈴木哲朗, 豊田哲也, 脇田隆宇: C 型肝炎ウイルス

- の複製増殖に関するウイルス遺伝子変異および遺伝子構造の解析. 同上.
- 49) 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, 脇田隆字: HCV E2 タンパク質の糖鎖機能の解析. 同上.
- 50) 森石恆司, 勝二郁夫, 鈴木亮介, 鈴木哲朗, 松浦善治: HCV コア蛋白質のプロテアソームによる分解とウイルス産生制御. 同上.
- 51) 木村敬郎, 鈴木亮介, 山越 智, 鈴木健裕, 堂前直, 勝二郁夫, 松浦善治, 千葉丈, 脇田隆字, 鈴木哲朗: Prohibitin2 は C 型肝炎ウイルス (HCV) NS5A 蛋白と相互作用し HCV 複製調節に働く. 同上.
- 52) Su Su Hmwe, 伊達朋子, 朝長充則, 脇田隆字, 鈴木哲朗: Generation of Hepatitis C virus NS3 mutations conferring resistance to the viral protease inhibitor by serial virus passage. 同上.
- 53) 鈴木亮介, 斎藤憲司, 安東友美, 石井孝司, 松浦善治, 宮村達男, 脇田隆字, 鈴木哲朗: C 型肝炎ウイルスの trans-packaging 系を用いた NS2 蛋白質の感染性粒子形成における機能解析. 同上.
- 54) 山本真民, 相崎英樹, 宮村達男, 濱野国勝, 脇田隆字, 鈴木哲朗: C型肝炎ウイルス粒子形成, 感染性に重要なコレステロール構造の解析. 同上.
- 55) 松田麻未, 李 天成, 清水 弘樹, 西村紳一郎, 片野晴隆, 中村智之, 畑中研一, 脇田隆字, 鈴木哲朗: ヒトポリオマウイルス BKV, JCV 及び MCV の糖脂質結合の比較解析. 同上.
- 56) 渡邊則幸, 相崎英樹, 松浦知和, 脇田隆字, 鈴木哲朗: C型肝炎ウイルス subgenomic replicon RNA を複製するヒト肝星細胞株の樹立. 同上.
- 57) 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, 脇田隆字: HCV E2 タンパク質の糖鎖機能の解析. 同上.
- 58) 久島透嘉, 脇田隆字, 土方 誠: core の変異体を用いた C 型肝炎ウイルスの粒子形成機構の解析. 同上.
- 59) 黒木美沙緒, 有海康雄, 池田正徳, 團迫浩方, 脇田隆字, 加藤宜之: 癌抑制遺伝子 PML は HCV 粒子産生に必要である. 同上.
- 60) 有海康雄, 黒木美沙緒, 牧正 敏, 池田正徳, 團迫浩方, 脇田隆字, 加藤宜之: ESCRT 小胞輸送系の HCV 産生への関与. 同上.
- 61) 赤澤大輔, 森山正樹, 尾見法昭, 中村紀子, 鈴木哲朗, 石井孝司, 脇田隆字: 培養細胞由来 HCV 粒子ワクチンの免疫による異なる遺伝子型 HCV 感染阻害活性の誘導. 同上.
- 62) 河合良成, 池田正徳, 矢野雅彦, 阿部健一, 西村剛, 團迫浩方, 有海康雄, 脇田隆字, 山本和秀, 加藤宜之: 抗潰瘍剤による C 型慢性肝炎の新たな治療戦略-Teprenone は Statin のグラニルグラニル化阻害を増強し HCV 複製抑制効果を増強する. 同上.
- 63) 岡智一郎, 高木弘隆, 遠矢幸伸, 武田直和, 脇田隆字, 片山和彦: バイオセンサー発現細胞を用いたネコカリシウイルス感染検出系の構築. 第 32 回日本分子生物学会年会, 横浜, 2009. 12. 9-12.
- 64) 勝二郁夫, 阿部克俊, 村上恭子, 石井孝司, 鈴木哲朗, 脇田隆字, 宮村達男, 小池和彦, 堀田博: The hnRNP H1 modulates production of HCV particles through interaction with HCV core protein and HCV IRES RNA. 第 32 回日本分子生物学会年会, 横浜, 2009.
- 65) 清水博之, 斎藤真紀, 小松俊彦, 杉山和良, 小林一司 大坪寛子: 野生株ポリオウイルス実験室封じ込めの現状と今後の課題. 第 9 回日本バイオセーフティ学会総会・学術集会, 仙台, 2009. 12. 10-11.
- 66) 岡智一郎, 高木弘隆, 脇田隆字, 片山和彦: ルシフェラーゼセンサーテクノロジーを用いたネコカリシウイルス感染検出系の構築. 日本薬学会第 130 年会, 岡山, 2010. 3. 28~30.
- 67) 染谷雄一, 白土東子, 脇田隆字: ノロウイルス

中空粒子の昆虫細胞での発現. 同上.

III. その他

- 1) 岡智一郎: ノロウイルスの迅速な検出に向けた取り組み. 第50回日本臨床ウイルス学会 ランチオンセミナー, 高知, 2009. 6.
- 2) 政木隆博: C型肝炎ウイルスの粒子形成機構の解析 (非構造蛋白NS5Aをリン酸化するプロテインキナーゼの探索). 第6回ウイルス学キャンプ in 湯河原, 熱海, 2009. 6. 29-30.
- 3) 安東友美, 今村博臣, 鈴木亮介, 脇田隆字, 鈴木哲朗: C型肝炎ウイルス複製複合体におけるATP制御の可視化と機能解析. 第8回感染症沖縄フォーラム, 沖縄, 2010. 2. 11-13.
- 4) 岡本有加, 政木隆博, 村山麻子, 加藤孝宣, 野本明男, 脇田隆字: HCV遺伝子型2b MA株を用いた感染増殖系開発の試み. 同上.
- 5) 金ソレイ, 岡本有加, 政木隆博, 渡邊治雄, 脇田隆字, 加藤孝宣: C型肝炎ウイルスgenotype 2bの感染増殖系作成の試み. 同上.
- 6) 岡智一郎: サポウイルスの分子疫学. 衛生微生物技術協議会第30回研究会, 2009. 7. 10.
- 7) 東方美保, 斎藤博之, 白土東子, 田中智之, 野田衛: 食品検体のノロウイルス検査に向けたパンソルビン・トラップ法の開発. 同上.
- 8) 清水博之: 東アジアにおけるエンテロウイルス71感染症の流行. 同上.
- 9) 岡智一郎: カリシウイルスの新知見. ウイルス性下痢症研究会第21回学術集会, 東京, 2009. 10.
- 10) 本村和嗣, 横山勝, 大出裕高, 中村浩美, 守宏美, 岡智一郎, 片山和彦, 神田忠仁, 田中智之, 武田直和, 佐藤裕徳: Norovirus Surveillance Group: ノロウイルス GII/4 の変異. 同上.
- 11) 加藤孝宣: HCV培養細胞適応変異株の同定と解析. HCV キャンプ in Yamanashi, 山梨, 2009. 12. 13-14.
- 12) 政木隆博: HCV NS5A蛋白のリン酸化に関与する新規セリン/スレオニンプロテインキナーゼの網羅的探索. 同上.
- 13) 清水博之: 腸管ウイルス感染症の現状と実験室診断, 野生株ポリオウイルスの実験室封じ込め. 平成21年度希少感染症診断技術研修会, 東京, 2010. 2. 25.
- 14) 片山和彦, 岡智一郎: 下痢症ウイルスの検出法アップデート(ノロウイルス, サポウイルスについて). 同上.
- 15) 加藤孝宣: HCV培養細胞感染増殖系を用いた薬剤耐性変異株の解析. Liver Forum in Kyoto 第12回学術集会, 京都, 2010. 3. 20.