

## 2. ウイルス第二部

部長 脇田 隆字

### 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、不活化ポリオワクチン、弱毒生ロタワクチンを検定、検査対象としている。

第1室は下痢症ウイルスを担当するとともに、ポリオワクチン、ロタワクチンの検定、検査を担当する。本年度はポリオ単独不活化ワクチン（サノフィ：イモバックスポリオ）の出検は1件、沈降精製百日せき破傷風不活化ポリオ（セービン株）混合ワクチンDPT-sIPV, 2種類（一般財団法人阪大微生物病研究会：テトラビック皮下注シリンジ、一般財団法人化学及血清療法研究所：クワトロバック皮下注シリンジ）は、中間段階5件、小分け製品14件の検定を行った。またサノフィ社のポリオ単独ワクチンを第一三共社のDPTと混合した沈降精製百日せき破傷風不活化ポリオ混合ワクチンDPT-cIPV, サノフィ第一三共：スクエアキッズ皮下注シリンジは、今年度初めて7件の出検があり、D抗原ELISAによる検定を実施した。ロタウイルスワクチンについてはGSK：ロタリックスが8件、MSD：ロタテックが6件出検され、検定を行った。ワクチン導入前後のロタウイルスの流行状況を把握するための研究、ロタウイルスの基礎研究が継続されたが、ワクチン導入によってロタウイルス重症入院症例が激減していることが明らかになった。

ノロウイルスに関しては、今年度よりノロウイルスワクチンシーズの開発研究が開始されると共に、流行予測プログラム開発のため全国の衛生研究所と協力しつつ、次世代シーケンサーを用いた下痢症ウイルス全ゲノム塩基配列解析と時系列分子系統解析が始まった。感染研ではレファレンスセンターとしての機能を良く果たすと同時に、カリシウイルスに関する基礎研究が進展している。X線解析、クライオ電顕による構造解析に関する研究に加え、ノロウイルスのリバースジェ

ネティックスが完成し、アメリカアカデミー誌に掲載された。このシステムを利用したノロウイルス感受性細胞に関する研究がスタートした。

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。西太平洋地域では2000年以来ポリオフリーを維持してきた。西太平洋地域以外でも野生株ポリオ流行国が後3カ国となり、いよいよ世界的ポリオ根絶達成およびその後のOPV接種停止が視野に入ってきている。WHOは2014年12月にポリオウイルス病原体管理に関する新たなWHO行動指針(GAP III-2014)を公開した。我が国でも本指針に対応したポリオウイルス病原体管理を進める必要がある。また、JICAとの共催により実施した第24回ポリオ実験室診断技術研修会(ポリオ及び麻疹を含むワクチン予防可能疾患の世界的制御のための実験室診断技術としては第5回目)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。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、行政検査をおこなった。

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。エンテロウイルス71感染受容体、ヒトPSGL-1に関する解析を進めている。環境中のエンテロウイルスサーベイランスも進めている。

第3室及び第4室ではB型およびC型肝炎ウイルスの行政研究および基礎研究をおこなった。行政研究としては、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、肝炎情報の収集とウイルス第二部のホームページにおいてデータベース構築および情報発信をおこなっている。検診で発見されるキャリアの治療導入が重要であり、肝炎ウイルス検査陽性者のフォローアップに

関しては自治体や医療機関と連携して全国レベルで展開している。基礎研究促進を目的に、肝炎研究基盤整備事業で肝炎セミナーを4回開催した。さらに、2月には国内の肝炎ウイルス研究者による肝炎ウイルス研修会を開催し、若手研究者の育成に努めた。B型肝炎ウイルスの研究では NTCP に関係するエントリー研究が進んだ。さらにウイルスの生活環に関わる宿主因子などの同定および解析が進んだ。C型肝炎ウイルス研究も様々な研究課題が展開されているが、Direct Active Antiviral (DAA)による画期的な抗ウイルス療法の登場により、今後の研究の方向性を検討する時期にある。より効果的で安価な治療法の開発、感染予防法の開発が求められる。

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。本年度はA型肝炎ワクチン4件、B型肝炎ワクチン19件の検定をおこなった。B型肝炎ワクチンは定期接種化の方向性が基本方針部会です承された。定期接種導入前ではあるが出検数は増加傾向にあり、今後のさらなる増加に備える必要がある。このためにも動物を用いた力価試験から試験管内力価試験への切り替えが望まれる。E型肝炎ウイルスの研究ではレセプター探索研究とレプリコン細胞による抗ウイルス薬探索研究が進行している。また、免疫不全によると考えられる慢性E型肝炎患者の解析を行った。動物のE型肝炎ウイルスではラット、フェレット、ラクダ、スンクスなどの解析が進んだ。

以下のような国際的技術協力をおこなった。

#### 第4室

Lingbao Kong (中国、江西省、江西農業大学) <China Scholarship Council>平成25年8月24日～平成26年8月24日、C型肝炎分子生物学に関する研究。

#### 第5室

周 顕鳳 (中国江西省 CDC) <日中笹川奨学金制度研究者>平成26年5月～平成27年4月、E型肝炎の分子生物学に関する研究

人事面では、人事面では、平成26年8月に第三室に政木隆博主任研究官がノースカロライナ大学の留学から、平成26年9月には第一室に岡智一郎主任研究官がオハイオ州立大学の留学から復帰した。

## ウイルス第二部

<別> 検査業務

第1室:

検定業務

- ・ 4種混合ワクチンの力価試験（ラット免疫原性試験）14ロット
- ・ 3価混合不活化ポリオワクチン原液の不活化試験 6ロット
- ・ イモバックスポリオの力価試験（D抗原量試験）1ロット
- ・ スクエアキッズの力価試験（D抗原量試験）7ロット
- ・ ロタリックス検定 8ロット（H26/4-H27/3）（976948 doses）
- ・ ロタテック検定 6ロット（H26/4-H27/3）（499399 doses）

行政検査

第1室

ノロウイルス・サポウイルス・ロタウイルス

合計7件

第2室:

平成26年度は3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ワクチン株と同定された。

第4室

平成26年度は東京高等裁判所から命じられた鑑定を行った。

第5室:

検定業務

乾燥組織培養不活化A型肝炎ワクチン 4件（1件は前年度出検ロットの追試）

組換え沈降B型肝炎ワクチン（酵母由来） 19件  
（1件は次期参照沈降B型肝炎ワクチンの値付けを兼ねる。）

次期参照沈降B型肝炎ワクチンの値付け 2回

（検定分を含めて3回繰り返しとして値付けを行った。）

行政検査

A型肝炎 55件

E型肝炎 2件

業績

調査・研究

I. 下痢症ウイルスに関する研究

(1) ヒトノロウイルスリバーシジェネティックシステム構築に関する研究

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、ノロウイルスのゲノム RNA の 5' 末端に 107 塩基の付加配列が結合した capped RNA を合成する。107 塩基の付加配列に着目し、翻訳複製に必須な領域を探るため、改変不可配列を導入した Capped RNA を合成して、トランスフェクションによる新生粒子産生をモニターした。107 塩基の 5' 側は 30 塩基程度削り込んでも新生粒子産生能は低下しなかったが、3' 側を失った場合、粒子産生能が消失した。5' -GUGAAUGAAGAUG の直前の塩基配列が、新生粒子産生に極めて重要である可能性が示された。

[戸高玲子、芳賀慧、朴英斌、中西章(国立長寿医療研究センター)片山和彦]

(2) リバーシジェネティックシステムを用いたヒトノロウイルスの複製機構の解析

ヒトノロウイルスの複製機構を明らかにするため、U201 株 HuNoV 発現プラスミドを導入した HEK293FT 細胞を透過型電子顕微鏡により解析した。その結果、直径 150~500 nm の小胞が細胞内に観察され、それらの小胞の周囲には約 20 nm の粒子が存在することを明らかにした。また小胞を形成している最中と考えられる膜構造物も観察された。さらに、細胞内部の粒子様構造物を観察するため、クライオ電子顕微鏡を用いた観察、トモグラフィーを用いた観察準備を始めた。

[村上耕介、Mary Estes (米国ペイラー医科大学)、村田和義 (生理学研究所)、戸高玲子、芳賀慧、片山和彦]

(3) ノロウイルスを利用した経口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に加え、マウスノロウ

イルスを利用した遺伝子導入ベクターの作製を試みた。ヒトノロウイルスのリバーシジェネティックシステムをベースに構築した pKS-MNV-S7 プラスミドは、HEK293T 細胞にトランスフェクションすると感染性新生 MNV-S7 ウイルスを産生する。このプラスミドクローンの MNV-ORF3 を定常的に発現する HEK293T 細胞を構築し、そこに ORF3 部分を外来性遺伝子 (VENUS) に入れ替えたコンストラクトをトランスフェクションした。すると、ORF3 を VENUS に置き換えた遺伝子を内包した感染性の新生 MNV を産生することが明らかになった。本研究で、ORF3 遺伝子を外来性遺伝子に置き換えることに成功した。

[中西章(国立長寿医療研究センター)、戸高玲子、村上耕介、三木元博 (デンカ生研)、脇田隆宇、片山和彦]

(4) ヒトノロウイルスのゲノム解析

2000 年以降のノロウイルス感染患者便検体を全国の地方衛生研究所の協力により収集し、次世代シーケンサー (MiSeq: イルミナ) を用いてノロウイルスの網羅的なゲノム全長の塩基配列の解析を開始した。約 700 件の解析が進行している。この解析が進めば、ベイジアン法を用いた時系列分子系統解析により、流行株出現のメカニズムが明らかになる可能性がある。

[芳賀慧、片山和彦、戸高玲子、木村博一 (感染症疫学センター)、黒田誠 (病原体ゲノム解析センター)、四宮博人 (愛媛県衛生環境研究所)]

(5) GatVirusWeb 整備、病原体ゲノムライブラリーの構築

CaliciWeb をアップグレードした下痢症ウイルス全般を含むウイルスデータベース、情報共有サイトの GatVirusWeb を立ち上げ、国内外への塩基配列データ共有化を進めた。さらに、本年度よりスタートした 2000 年以降の国内の下痢症ウイルスの全塩基配列解析結果をまとめ、データベース登録への準備を進める。また、NoroNet typing tool へのリンクを準備するとともに、感染研病原体ゲノム解析センターとも連携を図り、ゲノムデータベースプロジェクトとの連携をすすめる。

[三瀬敬治 (札幌医大)、朴英斌、戸高玲子、藤井克樹、

芳賀慧、片山和彦]

(6) ヒトノロウイルスの遺伝子型分別方法の国際統一にかか研究

昨年度、我々は、ノロウイルスサイエンティフィックコミッティー（国際的に合意の得られた遺伝子型別を決定する組織）の一員として、この要望に答える ORF1 の RdRp コード領域と ORF2 の capsid コード領域を用いた遺伝子型分類法を確立した。今年度は、本方法の国内への普及活動をノロウイルスレファレンスセンターを通じて行った。さらに、遺伝子型表記方法を統一するため、感染研感染症疫学センターと協力しつつ、NESID、IASR、IDWR の遺伝子型表記を改訂する準備を開始した。

[片山和彦、戸高玲子、芳賀慧、朴英斌、木村博一、木下一美、吉川昌江(感染症疫学センター)]

(7) ヒト腸管オルガノイド培養技術の導入

ヒトに感染するノロウイルス (HuNoV) は、ヒト腸管上皮では非常に効率よく増殖可能だが、株化培養細胞を用いて増殖させることはできない。慶応大学医学部の准教授である佐藤俊郎らは、ヒト腸管バイオブシより、幹細胞に刺激を与え、増殖培養させた後に、試験管内でヒト腸管の組織を再構築可能な培養システムの開発に成功した。我々は、佐藤准教授より技術指導を受け、腸管オルガノイドを用いた HuNoV 感染増殖システムを研究するため、オルガノイドの導入を行った。

[片山和彦、戸高玲子、藤本陽、村上耕介、染谷雄一、石井孝司、佐藤悦郎、杉本真也 (慶応大学医学部)]

(8) ノロウイルスの網羅的 VLP および抗体の作製

ヒトノロウイルスは、感染モデル動物も存在せず、培養細胞で増殖させることもできず研究の進行が遅れている。ノロウイルスの研究、抗原抗体検出システムの開発などにウイルス様中空粒子 (VLP) と、それを用いて作製する抗血清は、研究用ツールとして極めて有用である。当部室では、VLP と抗血清の作製を継続し、パネルを維持している。本年度は 2 種類の新たなヒトノロウイルス VLP、抗血清を作製した。また、VLP ライブラリーを用いて、VLP 特

異的モノクローナル抗体、GI もしくは GII をブロードレンジに認識するモノクローナル抗体の作製を開始した。

[三木元博 (デンカ生研)、杉本陽、朴英斌、戸高玲子、芳賀慧、脇田隆宇、片山和彦]

(9) ノロウイルス RNA 依存的 RNA ポリメラーゼによる in vitro RNA 合成系の構築

ノロウイルスの複製機構を明らかにするために、ヒトノロウイルスの RNA 依存的 RNA ポリメラーゼ (RdRp) の RNA 転写活性を、放射性同位体を用いずに測定出来る in vitro 系を構築した。鋳型 RNA と精製 RdRp により合成された RNA を、一本鎖 RNA のみを特異的に切断分解する RNase を用いて、合成された RNA と鋳型 RNA とが形成した二本鎖 RNA のみを検出することで、合成された RNA を検出する系である。その結果 RdRp の転写活性は、鋳型の配列特異的で、ゲノム RNA の 5'末端、或いは 3'末端領域の配列が重要であることが明らかとなった。

[下池貴志、脇田隆宇]

(10) ノロウイルス RNA 依存的 RNA ポリメラーゼ (RdRp) の結晶構造解析と機能の解析、細胞内活性測定システムの構築

HuNoV と MNV の RdRp を大腸菌で発現させ、活性のある RdRp を得ることに成功した。昨年度から、RdRp の結晶化を試みたところ、HuNoV GII.3 U201 株、MNV-S7 株の結晶化に成功し、結晶構造を得た。しかし、これらの結晶は、核酸が結合していないオープンコフィグレーションフォームであった。RdRp の RNA 認識機構を解明し、RNA 分子との共結晶像をえるため、RdRp に人工合成 RNA を反応させ、その結合能力、RNA 鎖合成能力を測定している。

リバースジェネティックシステムを利用し、ORF2 部分に Luciferase 遺伝子を導入したコンストラクトを作製し、RdRp の活性測定を試みた。HuNoV GII.3 U201 株、MNV-S7 株で、細胞内 RdRp 活性測定が可能となった。[朴英斌、戸高玲子、芳賀慧、朴三用 (横浜市立大学)、佐藤裕徳、横山勝 (病原体ゲノム解析センター)]

(11) ヒトノロウイルスの感染に関与する真のレセプターの探索法の検討

我々は、組織血液型抗原 (HBGA) はヒトノロウイルス (HUNoV) の腸管粘膜層への接着には関与するが、細胞への結合には別の分子が関与していることを明らかにし、HuNoV の真のレセプターを探している。腸管上皮細胞のプロテオミクス解析により取得したレセプター候補分子のクローンを取得し、解析を進めている。また、リバーシジェネティクスで作製した GFP 遺伝子内包ウイルスを用いて、その結合、細胞内発現を許容する株化培養細胞を探している。

[村上耕介, Mary Estes (米国ベイラー医科大学), 芳賀慧, 藤本陽, 戸高玲子, 片山和彦]

(12) ノロウイルス中和抗体認識部位の同定

ヒトノロウイルスは、株化された感受性細胞が無いいため、試験管内で増殖させることができない、そのため抗体の中和効果を検出することができず、VLP で誘導した抗体を用いた研究成果により、感染防御に関わる抗体を予測している。一方、マウスノロウイルスは、感受性細胞 RAW での試験管内増殖は可能だが、VLP を安定して作成することができない。我々は、マウスノロウイルス VLP の安定した作成に成功し、これをウサギ、モルモット、マウスに免疫し、中和活性のある抗血清を誘導することに成功するとともに、モノクローナル抗体を得ることに成功した。現在、中和活性のあるモノクローナル抗体のエピトープを検索している。さらに、モノクローナル抗体の結合部位を可視化するため、感染性 MNV に中和モノクローナル抗体を結合させ、クライオ電子顕微鏡を用いて観察を行っている。[三木元博 (デンカ生研)、戸高玲子, 藤本陽, 朴英斌, 村田和義 (岡崎生理学研究所)、片山和彦]

(13) ヒトノロウイルス感受性細胞樹立の試み

ヒトノロウイルス感受性細胞をスクリーニングするため、リバーシジェネティクスシステムにより、GFP 遺伝子を内包した感染性ヒトノロウイルス粒子を作製した。この感染性ウイルスは、ウイルスプロテアーゼの活性を

ロックアウトしてあるため、感染細胞はウイルス感染後もダメージを受けず、生存を続けることができる。さらに、本ウイルスの感染により、細胞内に GFP が発現するため、感受性細胞を GFP の傾向の有無により分別可能である。現在、細胞にダメージをほとんど与えず、密閉されたカセットないでのセルソーティングが可能な On Chip Bio 社のセルソーターを用いて、感受性細胞のスクリーニングを行っている。[戸高玲子, 三木元博 (デンカ生研)、村上耕介, 朴英斌, 片山和彦]

(14) ノロウイルス RNA レプリコン候補遺伝子の作成と構造タンパク質発現細胞の作成

これまで培養細胞での増殖系が確立されていないノロウイルスの遺伝子及び粒子複製機構を明らかにするため、ノロウイルス遺伝子を RNA レプリコンとして持続的に維持できる細胞を確立することを目指す。ノロウイルスチバ株 ORF1 遺伝子下流に HCV IRES 支配のネオマイシン (あるいはピューロマイシン) 耐性遺伝子を配置し、in vitro で T7 RNA ポリメラーゼにより RNA を合成した。また、チバ株構造タンパク質遺伝子 (ORF2-ORF3) を含むプラスミドを Vero 細胞に導入し、適当な薬剤で選択したところ、耐性細胞を得た。今後、タンパク質発現を確認する。

[染谷雄一]

(15) ノロウイルス VLP の構造解析

ノロウイルスチバ株 (GI.4) をはじめ、主な GI 株の VLP を昆虫細胞で調製した。X 線結晶構造解析を高輝度光科学研究センターで、電子顕微鏡単粒子解析を理化学研究所ライフサイエンス技術基盤研究センターで行うため、それぞれに VLP を供給した。

[染谷雄一、長谷川和也 (高輝度光科学研究センター)、熊坂崇 (高輝度光科学研究センター)、染谷友美 (理化学研究所)]

(16) NoV と血液型抗原との結合: 結晶構造を基にしたキャプシドタンパク質と血液型抗原との結合エネルギー解析

本研究では、NoVの糖鎖認識の多様性を理解するため、X線結晶構造解析とQM/MM計算、分子動力学計算を組み合わせた複合シミュレーション手法を適用し、各種血液型抗原とノロウイルスキャプシドタンパク質との結合様式のモデリング／解析を進めている。今年度はキャプシドタンパク質上のアミノ酸変位が血液型抗原結合に及ぼす相対的エネルギー変化に注目し、相互作用成分解析と結合自由エネルギー変化について解析を行った。その結果、ルイスb血液型抗原とキャプシドタンパク質との相互作用に関して結果を得ることが出来た。アミノ酸変異に伴った局所的な構造変化／水和相互作用の変化が主要因となって血液型抗原結合の強弱が変化することを明らかにした。これは結晶構造解析から示唆される事実と一致することが確認出来た。

[白土東子, 石田豊和 (産総研), 熊谷安希子, 伊藤浩美 (産総研), 古川早苗 (産総研), 染谷雄一, 石井孝司, 脇田隆宇, 成松久 (産総研), 久保田智巳 (産総研)]

#### (17) ヒト型抗ノロウイルス抗体のウイルス-血液型抗原吸着阻害活性の検討

本研究では、ヒト由来ファージ抗体ライブラリーから多数の抗NoV抗体を単離・解析し、交叉反応性抗NoV中和抗体の作製を試みる。昨年度までに、NoV GI.4 遺伝子型株、GII.4 遺伝子型株を抗原として単離したヒト型モノクローナル抗体がGI.4 遺伝子型株、GI.4 遺伝子型株の血液型抗原への結合を阻害することを明らかにしている。今年度は、これらモノクローナル抗体が他の遺伝子型株に関しても血液型抗原への結合を阻害するかどうかの検討を行った。10 遺伝子型 10 株のウイルス様中空粒子を用いたELISAの結果、ヒト型モノクローナル抗体が、GI.4, GII.4 遺伝子型株以外の株の血液型抗原へ結合に対しても阻害効果を示すことを明らかにした。交差反応性の高い抗体は、他の遺伝子型株の血液型抗原への結合も阻害した。これに対し、交差反応性の低い抗体は、他の遺伝子型株の血液型抗原への結合は阻害しないことを明らかにした。

[白土東子, 守口匡子 (藤田保健衛生大学), 染谷雄一, 奥野良信 (阪大微研), 黒澤良和 (藤田保健衛生大学),

谷口孝喜 (藤田保健衛生大学)]

#### (18) ノロウイルス感染性粒子構造の研究

我々はノロウイルスの感染性粒子構造を明らかにするため、MNV 感染性粒子と MNV-VLP の構造の比較、HuNoV の感染性粒子と VLP の構造の比較を構造生物学的手法と生化学的手法を用いて行っている。本年度は、クライオ電子顕微鏡観察, クライオ位相差トモグラフィーを用いて MNV 感染性粒子構造と VLP の構造を解析し、両者の形状に差があることを見いだした。感染性粒子は粒子状の突起の隆起高が高く、シェルドメインが粒子内部に向かってくぼんでいるが、VLP は突起の隆起高が低く、シェルドメインが外部方向に隆起していることが分かった。

[三木元博, 芳賀慧, 戸高玲子, 朴英斌, 村田和義 (岡崎生理研), 片山和彦]

#### (20) ヒトノロウイルス・マウスノロウイルスのウイルスタンパク質の結晶構造解析の試み

ノロウイルスで、タンパク質翻訳因子, ゲノム合成開始因子などの機能が予測されている VPg と構造タンパク質と非構造タンパク質としての機能を併せ持つと予測されている VP2 の二つの分子に加え、本年度は、これらの分子とコンプレックスを形成して活性を発揮することが予測されている RNA dependent RNA polymerase (RdRp) の構造解析を開始した。HuNoV, MNV RdRp の結晶化に成功し、X線によるリフレクションパターンの取得に成功した。立体構造を構築し、*in silico*での構造評価を行った結果、クローズドコンフィグレーションであることが判明した。クローズドコンフィグレーションの RdRp は本来、RNA を抱き込んだ状態で形成される形状であるが、我々の RdRp には、いかなる RNA も結合していなかった。RdRp の形状、アミノ酸残基と RNA の結合様式を明らかにし、遺伝子型によって異なる RdRp のアミノ酸多様性、構造変化がウイルスの病原性変化に影響を与えるか否か、分子疫学の標的領域になり得るか否かを解析するためには、RNA と結合したクローズドコンフィグレーションの RdRp の構造を決定する必要がある。

[朴英斌, 朴三用 (横浜市立大学), 戸高玲子, 横山勝, 佐藤裕徳(病原体ゲノム解析センター), 片山和彦]

## 2. 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プロテアーゼの基質を模倣した非ペプチド性化合物の抗ウイルス活性の評価

我々はカリシプロテアーゼの基質認識機構の解析を進めてきた。今回、計139369化合物のライブラリーから、FCV プロテアーゼの基質の構造特性をもち、基質会合部位の空間に適合する化合物を結合シミュレーションで選択した。その後、生物発光共鳴エネルギー移動法を利用したFCV感染・増殖時のFCV プロテアーゼ活性発現定量系で評価した結果、2つの非ペプチド性低分子化合物がFCVプロテアーゼの細胞内活性発現を抑制することを見いだした。今回用いたアプローチは、ノロウイルスやサポウイルスのプロテアーゼをターゲットにしたリード化合物の探索にも有用な手法の1つとなりうる。

[岡智一郎, 横山勝(病原体ゲノム解析センター), 高木弘隆 (バイオセーフティ管理室), 小島 宏建, 長野 哲雄, 岡部 隆義 (東京大学創薬機構), 遠矢幸伸 (日大獣医), 片山 和彦, 佐藤 裕徳(病原体ゲノム解析センター)]

## 3. ロタウイルスに関する研究

### (1) 2013/14年シーズンの我が国におけるロタウイルス分子疫学研究

#### ア) 2013/14年シーズンのロタウイルス検体の収集

我が国におけるロタウイルスの網羅的分子疫学調査を実施するため、全国4病院から5歳未満の急性胃腸炎による入院症例の便検体を収集した。2013年9月から2014年3月の間に合計125検体を収集し、ELISA法にてスクリーニングを行ったところ、14検体がロタウイルス陽性であった。各病院の陽性率は、由利組合総合病院 (秋田) 8.0% (2検体/25検体)、江南厚生病院 (愛知) 同9.1% (6検体/66検体)、公立南丹病院 (京都) 0% (0検体/16検体)、山口大学医学部付属病院 (山口) 同33.3% (6検体/18検体) であり、いずれの病院でも前

シーズン同時期と比較して、陽性率が大幅に減少していた。

[藤井克樹、芳賀慧、団海燕、片山和彦]

#### イ) ロタウイルス全塩基配列解析による遺伝子型構成解析

ロタウイルス陽性 14 検体について、次世代シーケンシング解析を行い、それぞれの遺伝子型構成を調べたところ、各検体の遺伝子型構成は G1-P[8]-I1-R1-C1-M1-A1-N1-T1-E1-H1 (以下 Wa 型 G1 と記す)、G2-P[4]-I2-R2-C2-M2-A2-N2-T2-E2-H2 (同 G2)、G9-P[8]-I1-R1-C1-M1-A1-N1-T1-E1-H1 (同 G9) の 3 種類のパターンに分類できた。G9 に関しては塩基配列の違いから、更に Lineage 3 と Lineage 6 に分類することができた。また、前シーズンまで広く流行していた DS-1 型 G1 株は 1 例も検出されなかった。

[藤井克樹、芳賀慧、団海燕、片山和彦]

#### ウ) 全国のロタウイルスの遺伝子型分布

2013/14 年シーズンに採取されたロタウイルス陽性 14 検体について、各病院の遺伝子型分布を調べたところ、秋田は Wa 型 G9 Lineage 3 が 2 検体のみ、愛知は Wa 型 G1 が 1 検体、G2 が 3 検体、G9 Lineage 6 が 2 検体、山口は G2 が 4 検体、G9 Lineage 6 が 2 検体であった。重複感染例は認められなかった。この結果から、2013/14 年シーズンは前シーズンと比較してロタ陽性検体が大幅に減少し、その遺伝子型分布も大きく変化していることが明らかとなった。

[藤井克樹、芳賀慧、団海燕、片山和彦]

#### エ) 北海道におけるロタウイルス分子疫学解析

札幌医科大学との共同研究として、北海道の浦河、苫小牧、室蘭、札幌、岩見沢、函館の病院からロタウイルス陽性便検体をそれぞれ 9, 18, 13, 7, 4, 1 検体ずつ (計 52 検体) 送付してもらい、全ウイルスゲノムを次世代シーケンサーにて解析した。その結果、遺伝子型分布は Wa 型 G1 が 13 検体 (25%)、DS-1 型 G1 が 7 検体 (13%)、G2 が 12 検体 (23%)、G9 Lineage 3 が 9



検体 (17%)、G9 Lineage 6 が 7 検体 (13%)、重複感染が 4 検体 (8%) であった。この結果から、2014 年においても地域によっては DS-1 型 G1 株が未だ流行していることが明らかとなった。

[藤井克樹、津川毅 (札幌医科大学)、片山和彦]

#### (2) 核酸自動電気泳動装置によるロタウイルスゲノムパターン解析法の確立

ロタウイルスの簡便・迅速な検査法を確立するため、核酸自動電気泳動装置 MultiNA (島津製作所) を用いてロタウイルスゲノムの電気泳動パターンを検証した。その結果、ロタウイルスの 11 本のゲノムを泳動度に応じて 3 分割し、それぞれの検出波形から相関係数を算出して比較することにより、PAGE 法と同様に Wa-like G1、DS-1-like G1、G2、G3、G4、G9 lineage 3、G9 lineage 6 を区別して判定する事ができた。この方法は、新たなロタウイルス検出法として応用可能であると考えられた。

[藤井克樹、下池貴志、片山和彦]

#### (3) マウスロタウイルスを用いた宿主免疫応答の解析

##### ア) マウスロタウイルス接種後の腸管における CD 抗原発現量の変化

生後 10 日の Balb/c マウスにマウスロタウイルス EW 株を 10000 DD<sub>50</sub> (50% 下痢発症用量) 経口接種し、経時的に回腸を採取した。回腸から RNA を抽出し、リアルタイム PCR にて CD3、CD4、CD8、CD20 の発現量を定量した。内部標準として GAPDH と beta-actin を用いた。その結果、ウイルス接種 3 日後では、いずれの CD 抗原の発現量ともコントロールマウスより低い値を示したが、5 日後には逆転し、7 日後には発現量がピークとなった。特に CD3 と CD8 がコントロールの 3 倍程度と高い値を示した。

[藤井克樹、片山和彦]

##### イ) ウイルス接種後の腸管における TCR (T cell receptor) レパトア解析

マウスロタウイルスを接種して 7 日後に採取した回腸について、RNA を抽出して TCR 遺伝子を網羅的に増幅し、次世代シーケンサーによる TCR レパトア解析を行った。その結果、ウイルス感染マウスではコントロールマウスと比較して、 $\alpha$  鎖では TRAV3-1、TRAV3-3、TRAV6-6、TRAV13-1、TRAV16、TRAV21 において、 $\beta$  鎖では TRBV2、TRBV4、TRBV13-2、TRBV17、TRBV29 において、相対的発現量が増加していた。特に TRAV3-3、TRAV16、TRAV21、TRBV13-2、TRBV29 においては特徴的な CDR3 の配列が認められた。

[藤井克樹、片山和彦]

#### 4. その他

##### (1) セービン株由来不活化ポリオワクチンを含む 4 種混合ワクチンの D 抗原量試験法の確立

現在使われているセービン株由来不活化ポリオワクチン 2 種には免疫賦活剤としてアルミニウムが含まれる。アルミニウム除去剤としてクエン酸ナトリウムと EDTA を選択し、ワクチン製剤を処理するときの除去剤の濃度、処理温度、処理時間を検討した。

[染谷雄一]

##### (2) 血液製剤における C 型肝炎ウイルスの加熱による不活化機構の解明

血液製剤に混入する可能性がある C 型肝炎ウイルス (HCV) を不活化させる条件を明らかにするため本実験を行っている。HCV はアルブミン中、60°C 液状加熱で効率良く不活化されることを示した。本年度はこの液状加熱で HCV の不活化の理由を明らかにするため実験を行った。その結果 HCV のアルブミン中での 60°C 液状加熱による不活化は、HCV RNA の分解によるよりも、HCV の細胞への吸着、侵入課程の阻害によることが主たる原因であることが示唆された。

[下池貴志、野島清子\*、脇田隆宇、岡田義昭\*\* \* : 血液・安全性研究部, \*\* : 埼玉医科大学]

##### (3) Cohn の血漿分画法による C 型肝炎ウイルスの不活化の評価

血漿分画製剤は献血血が原料のプール血漿を Cohn エタノール分画法により製造される。これまで第IX因子製剤、フィブリノゲン製剤による HCV 感染事例が報告されて来たが、グロブリン、アルブミン製剤における HCV 感染事故はほとんどない。この理由を明らかにするために、実験室レベルでの Cohn エタノール分画法を確立した。この方法により、クリオ/脱クリオ分画では 99.9%の HCV が脱クリオ画分に分画され、Fra.1/S1 分画では 99.3%の HCV が S1 上清画分に分画されることが明らかとなった。

[野島清子\*、下池貴志、脇田隆宇、岡田義昭\*\* \*：血液・安全性研究部, \*\*: 埼玉医科大学]

## レファレンス業務

### I. 病原体検出マニュアル

ロタウイルスの病原体検出マニュアルを作成し、web 上で公開した。

[藤井克樹、片山和彦]

### II. 標準品の作製

リアルタイムPCRでロタウイルス遺伝子を検出・定量する際の標準品を作成し、必要に応じて配布できる体制を整えた。

[藤井克樹、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

アア) 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。2014 年度は、エンテロウイルス抗血清 39 種類(8 カ所)、細胞 12 本(8 カ所)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。

[吉田 弘, 有田峰太郎, 片岡周子, 中村朋史, 清水博之]

イ) H25 年度に実施した地方衛生研究所におけるエン

テロウイルス検査状況に関するアンケート結果を踏まえ、エンテロウイルス検査に関する基盤的技術を含むワークショップを開催した。ワークショップでは実技を踏まえ、関連するマニュアルを参加者間のグループディスカッションにより作成した。作成した作業書は地方衛生研究所全国協議会を通じ共有している。

[エンテロウイルスレファレンスセンター：福島県衛研（北海道・東北・新潟）、神奈川県衛研（関東・甲信・静）、愛知県衛研（東海・北陸）、神戸市環保研（近畿）、愛媛県衛環研（中国・四国）、福岡県保環研（九州）、ウイルス第二部]

(2) 不活化ポリオワクチン(IPV)導入後の環境水サーベイランス(2 年目)

わが国では 2012 年 9 月より IPV が導入された。これに伴い環境水調査によるポリオウイルスサーベイランスを全国 13 か所にて平成 25 (2013) 年度春より順次開始した。平成 26 年度は予算事業として 14 か所、調査研究 5 か所の計 19 か所の協力を得て調査を実施した。19 か所の下水利用人口は、延べ約 500 万人である。開始以来、2 年目にあたる 2014 年 10 月 1 日に採水した下水濃縮物より 3 型ポリオウイルス株が分離された。分離株は感染症流行予測調査事業実施要領に基づき感染研ウイルス第二部に送付され、型内鑑別の結果、ワクチン株 (Sabin3) であることが確認された。同年 11 月以降、環境水からポリオウイルスは検出されていない。ポリオウイルス検出は国内 1 か所のみであったため、下水におけるウイルス検出は一過性のものであると推察された。引き続きポリオウイルスの監視を行っていく。

[安藤克幸(佐賀県衛薬セ)、伊藤雅(愛知県衛研)、伊東愛梨(宮崎県衛環研)、内野清子、岡山文香(堺市衛研)、内山友里恵(長野県環保研)、小澤広規(横浜市衛研)、北川和寛(福島県衛研)、葛口剛(岐阜県保環研)、後藤明子(北海道衛研)、下野尚悦(和歌山県環衛研セ)、神保達也(浜松市保環研)、高橋雅輝(岩手県環保研セ)、滝澤剛則(富山県衛研)、筒井理華(青森県環保セ)、中野守(奈良県保研セ)、濱崎光宏(福岡県保環研)、堀田千恵美(千葉県衛研)、松岡保

博(岡山県環保セ)、山崎謙治、中田恵子(大阪府公衛研)、吉田弘(感染研)]

(3) ポリオを含むワクチン予防可能疾患の世界的制御のための実験室診断技術集団研修(JICA共催)の開催

第24回ポリオ実験室診断技術研修会(ポリオ及び麻疹を含むワクチン予防可能疾患の世界的制御のための実験室診断技術としては第5回目)を実施した。感染研での研修期間は2015年1月19日~2月21日、研修参加者は、エジプトから1名、ベトナム、モザンビークから各2名、ナイジェリアから3名の計8名であった。WHOワクチン予防可能疾患実験室ネットワークにおける国家実験室に必要な技術習得のための実習および講義を実施した。また、ポリオ根絶および麻疹排除の現状と問題点を中心とした講義および討議を行った。

[清水博之、吉田弘、有田峰太郎、片岡周子、中村朋史、和田純子、脇田隆宇]

(4) 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170検体およびラオス56検体のAFP由来糞便からポリオウイルスの分離および同定を行った。

[吉田弘、有田峰太郎、片岡周子、中村朋史、和田純子、清水博之]

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。野生株ポリオウイルスおよびVDPVは検出されなかった。

[吉田弘、有田峰太郎、片岡周子、中村朋史、和田純子、清水博之]

ウ) 2014年5月18日~5月27日に Public Health Laboratory Center(香港)で開催された WHO Hands-on

Training Workshop on Cell Culture Techniques for the Laboratory Diagnosis of Polio/Enteroviruses and Measles/Rubella Viruses in the Western Pacific Region に講師(WHO 短期専門家)として参加し、培養細胞の維持管理・品質管理、培養細胞を用いたポリオウイルス分離・同定法等に関する講義を担当し、実習のサポートを行った。

[清水博之]

エ) 2014年6月25日~6月27日にWHO本部(ジュネーブ、スイス)で開催された Meeting of the Ad Hoc Small Working Group on improving Polio Laboratory diagnostics (6/25, 2014)および The 20th Informal Consultation of the Global Polio Laboratory Network (6/26-27)に WHO 短期専門家として参加し、環境水等の検体からのポリオウイルス直接検出法について発表し(Concentration of PV-particles in stool and sewage samples)、世界ポリオ実験室ネットワークにおける技術的課題に関する討議に参加した。

[清水博之]

オ) 2014年11月12日~11月15日にWPRO(マニラ、フィリピン)において開催された THE FIRST REGIONAL FORUM OF WHO COLLABORATING CENTRES IN THE WESTERN PACIFIC に参加し、WHO Collaborating Centre for Virus Reference and Research (Enteroviruses)に関するポスター発表を行い、各 WHO Collaborating Centre 担当者および WHO/WPRO 担当者と、各 WHO Collaborating Centre の機能と今後の課題に関する討議を行った。

[清水博之]

カ) 2015年1月28日~2月1日に Le Meridian ホテル(アンマン、ヨルダン)で開催された「WHO ポリオ実験室診断小委員会会合」(Meeting of the Ad Hoc Small Working Group discussion on improving Polio Laboratory diagnostics)に、WHO 短期専門家として参加し、ポリオ実験室ネットワークの現状について情報交換を行うとともに技術的問題点について議論した。

[清水博之]

キ) 日本ポリオ根絶会議構成員として、Country Progress Report on Maintaining Polio-free Status in Japan for the 20<sup>th</sup> Regional Commission for the Certification of Poliomyelitis Eradication in the Western Pacific ドラフト作成と会議資料作成を担当した。

[清水博之]

### (5) 国際協力活動

ア) 2015年3月3日感染研で開催された日中韓 The 2nd Symposium on Research and Quality Control of Vaccines においてエンテロウイルス 71 受容体研究の進捗について報告した。

[清水博之]

イ) 2014年7月13日-7月23日にベトナム国立衛生疫学研究所(NIHE)において開催された、JICA バイオセーフティワークショップおよび手足口病実験室診断技術研修会へ参加し、NIHE を含む四カ所の基幹国立研究所からの研修参加者に対して、ベトナム国内初の手足口病実験室診断技術研修を実施した。手足口病実験室診断に必要とされるバイオセーフティ、手足口病および関連ウイルス実験室診断に関する講義および技術指導を実施するとともに、各基幹研究所における手足口病サーベイランスおよび実験室診断の現状について情報の共有化を図った。

[清水博之]

## 2. WHO 西太平洋地域の 2014 年のポリオウイルス分離状況

### (1) WHO 西太平洋地域のポリオウイルス分離状況

2014年にラオスおよびカンボジアから送付された AFP 症例由来の糞便検体 226 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。ベトナム、カンボジアにおいて 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は検出されなかった。

[清水博之、吉田弘、有田峰太郎、片岡周子、中村朋史、和田純子、脇田隆宇]

### 3. 世界ポリオ根絶計画に関わる研究

#### (1) 便抽出液検体からのポリオウイルス検出法の開発

これまでの解析から、ポリオウイルスレセプター分子を高密度で結合させたナノ磁性ビーズ (PVR MB) を用いて、便抽出液のような夾雑物を含む臨床検体からでも効率よくポリオウイルスが抽出できることが示されている。しかし、便抽出液の中のポリオウイルスの量自体が非常に少ないため (陽性の検体で 100 uL 中にウイルスゲノムが 760 コピーしか検出されない場合もある)、ビーズで抽出したポリオウイルスを直接検出することが困難であった。そこで、50 コピー以下のポリオウイルスゲノムからカプシド領域全体 (3.9 knt) を効率よく上げることが出来る系を開発した (ECRA 法)。ECRA 法と磁気ビーズ PV 濃縮法、リアルタイム PCR および VP1 領域遺伝子解析を組み合わせることで、培養細胞を用いた場合と同程度の効率で PV を便抽出液から直接検出することが可能となった。

[有田峰太郎、中村朋史、清水博之]

#### (2) ウイルス受容体特異性を応用した環境水からのポリオウイルス直接検出法の開発

細胞培養を経ずに高感度で環境中のポリオウイルス (PV) を検出する手法 (直接検出法) の開発・検討を行った。始めに、力価既知の PV をバッファーに添加した系で直接検出法の評価を行った。陰電化膜 (NCF) および PV レセプター結合型磁気ビーズ (PVR-MB) を用いて濃縮した PV から得た RNA を PV の型別同定法である Poliovirus intratypic differentiation Real-time RT-PCR (rRT-PCR ITD 法) にて解析した。しかしながら、細胞培養を用いる従来法と比較すると感度面で劣っていた。一方、得られた RNA からカプシド全領域特異的増幅法 (Arita, 2013) を用いて増幅した DNA 断片を次世代シーケンサー (MiSeq, illumina 社) で解析したところ、従来法に近い感度で

PV を検出可能であった。また、パキスタンの環境検体を用いた試験でも種々の PV を検出可能であったことから、直接検出法の有用性が示された。

[中村朋史, 有田峰太郎, Merja Roivainen, Sohail Zaidi, 清水博之]

### (3) ポリオワクチンに対する腸管免疫応答の測定

我々がこれまでに開発したポリオウイルス擬似ウイルスを用いた中和抗体の測定法を用いて、ポリオウイルスワクチン接種後の腸管免疫応答の解析を行った。ウイルスを用いた従来の中和法では便抽出液の持つ非特異的な細胞毒性やバクテリアの混入のために便抽出液中に存在している中和抗体の解析が進まなかったが、擬似ウイルスを用いた中和抗体の測定方法により解析が可能となった。結果、生ワクチン接種後の便抽出液中の抗ポリオウイルス中和活性とポリオ特異的 IgA に相関があること、生ワクチン接種後に誘導される抗ポリオウイルス中和抗体がウイルスの排出を抑制することが示唆された。

[有田峰太郎, Peter F. Wright]

### (4) 宿主因子 PI4KB および OSBP family I のポリオウイルス複製における役割の解析

これまでの解析から、抗エンテロウイルス薬候補化合物の標的として、ホスファチジルイノシトール 4-キナーゼ (PI4KB) /オキシステロール結合タンパク (OSBP) 経路が同定されている。しかし、PI4KB/OSBP 経路以外に抗エンテロウイルス薬候補化合物の標的となりうるものがあるかどうかについては不明であった。今回、標的が不明であった2つの抗エンテロウイルス薬候補化合物 oxoglaucine および pachypodol (Ro 09-0179)の直接の標的がPI4KBであることを明らかにした。この結果から、“培養細胞に対して毒性を示さずに宿主の活性を阻害する抗エンテロウイルス化合物は、全て PI4KB/OSBP 経路を標的とする”という仮説 (エンピロキシム仮説) を提唱した。

[有田峰太郎, Angel S. Galabov]

### (5) 2 型 VDPV 分離株の中和抗原性解析

ナイジェリアおよびベトナムで分離された2型 VDPV 分離株と親株である Sabin 2 型とのアミノ酸配列の比較によると、2 型 VDPV 分離株は、抗原性決定部位にアミノ酸変異を有していたため、2 型 VDPV 株の中和抗原性の変化について検討した。本試験に用いたヒト血清検体は、日本の健常成人に由来する血清検体で、イモバックスポリオ (conventional IPV; cIPV) 追加接種前後の血清を用いた。1 型と 3 型ポリオウイルスに対する平均中和抗体価は、Sabin 株と強毒株で違いが認められ、強毒株に対する中和抗体価は、Sabin 株に対する抗体価より低い傾向が認められた。2 型ポリオウイルスに対する平均中和抗体価は、Sabin 株と強毒株で大きな違いは認められなかった。2 型 VDPV 株に対する中和抗体価も、Sabin 株に対する中和抗体価と、ほぼ同等であり、抗原性の変化は認められなかった。

[福島慎二 (東京医大)、中野貴司 (川崎医大)、片岡周子、清水博之]

## 4. 日本におけるポリオフリーの維持に関わる研究

### (1) 不活化ポリオワクチン累積接種率調査

不活化ポリオワクチン (IPV) は、2012 年 9 月 1 日から定期接種ワクチンとして導入されたため、今回が初めての全国累積接種率調査となった。集計するにあたり、DPT の接種記録がある者を解析対象とした。つまり、回収された記録のうち、接種日が不明もしくは記録記載が不完全なものを除外し、DPT-IPV1 回目接種済みの 1,163 件と未接種の 17 件、DPT1 回目接種済みの 2,873 件と未接種の 13 件、合計 4,066 件の記録を集計した。ポリオ 1 回目相当の累積接種率曲線は DPT1 回目相当と同様に、生後 3 ヶ月から立ち上がり、生後 4-7 ヶ月で急上昇し、生後 8 ヶ月以降は緩やかに上昇していた。累積接種率は生後 12 ヶ月で 97.2% (95% CI : 96.6~97.6%) に、生後 24 ヶ月で 98.2% (95% CI : 97.8~98.6%) に達した。ポリオ追加相当の累積接種率曲線も DPT 追加相当と同様に、生後 17 ヶ月から立ち上がり、生後 24 ヶ月まで緩やかに上昇していた。累積接種率は、生後 24 ヶ月で 76.5% (95%CI :

75.1～77.8%)であった。

[崎山 弘 (崎山小児科)、清水博之]

#### (2) 日本人成人に対する不活化ポリオワクチン追加接種の免疫原性

わが国においても、2012年9月から不活化ポリオワクチン (inactivated polio vaccine, IPV) が導入された。まずは、乳児期の定期接種が経口生ポリオワクチン (oral polio vaccine, OPV) から IPV に移行されたが、IPV の年齢対象は小児に限定されたものではない。わが国では、1975-77 年生まれの世代はポリオウイルス 1 型に対する血清中和抗体保有率が他の世代より低く、彼らがポリオ流行地に渡航するなどポリオ感染のリスクが高いことが予想される場合は、OPV の追加接種を勧奨する機会であるとされてきた。また、ポリオワクチン未接種者や接種歴が不明の者に対する対応が必要な場合も想定される。したがって今後は、成人に対しても IPV の追加接種を行う機会があると考えられ、成人での免疫原性と安全性の検討を行う分担研究を実施した。健康成人 50 名を登録し、49 名に対して IPV を 2 回接種するプロトコルを終了した。結果は、過去に接種歴がある場合はほとんど全例で、IPV 1 回接種後に良好な抗体価の上昇が確認された。ただし、過去の接種歴が不明で、IPV 接種前に中和抗体を保有しない場合には、1 回の IPV 接種では抗体獲得は不十分な場合があると考えられた。

[福島慎二、濱田篤郎 (東京医大)、中野貴司 (川崎医大)、片岡周子、中村朋史、清水博之]

#### (3) 不活化ポリオワクチン導入前後の予防接種状況および抗体保有状況に関する研究

ポリオの定期接種に用いられるワクチンは 2012 年に OPV から IPV 含有ワクチン (cIPV : 9 月～、および DPT-sIPV : 11 月～) に変更されたが、この変更にとともなう予防接種状況ならびに抗体保有状況について、北海道、山形県、群馬県、千葉県、東京都、富山県、愛知県、山口県、愛媛県の各都道県の協力により実施された 2013 年度感染症流行予測調査におけるポリオ感

受性調査の結果を用いて検討を行った。5 歳未満の 1 回以上接種率 (接種歴不明者を除く) はいずれの年齢も 95%以上であり、2011～2012 年に問題となった OPV の接種控えによる未接種者の蓄積は解消されたと考えられた。また、多くが OPV の被接種者である 1～4 歳では 3 型の抗体保有率が 1 型や 2 型と比較して低かったが、IPV 含有ワクチン被接種者が大半を占めた 0 歳では血清型間の差は小さく、いずれの型に対しても高い抗体保有率を示した。OPV の 2 回接種では、腸管内で 1～3 型ウイルス同士の干渉作用により、3 型の抗体保有率が 1, 2 型に比して低いことが報告されてきた。しかし IPV の場合、血中の中和抗体は 1～3 型のいずれに対しても同等に上昇し、中和抗体保有率は接種率に比例してすべての型に対して高い結果となった。

[佐藤 弘, 多屋馨子 (感染症疫学センター)、清水博之]

#### (4) 原発性免疫不全症患者におけるワクチン由来ポリオウイルス排泄の検討

経口生ポリオウイルスワクチンは、まれにワクチン由来ポリオ様麻痺 (Vaccine associated paralytic polio, VAPP) を起こすことがある。特に、原発性免疫不全症では、持続感染を起こし VAPP になる頻度が高いとされているが、日本では、これまでに調査されていない。そのため、原発性免疫不全症患者の糞便中にポリオウイルスが排泄されているか解析する。低ガンマグロブリン血症を呈する原発性免疫不全症である伴性劣性無ガンマグロブリン血症患者、分類不能型免疫不全症患者を選定する。患者、代諾者に対して説明を行い、糞便検体から培養細胞を用いたウイルス分離を行い、ポリオウイルスが分離された場合、遺伝子解析等、より詳細な解析を行う。

[野々山恵章 (防衛医大)、中村朋史、清水博之]

#### 5. エンテロウイルスおよびその他腸管ウイルスに関する研究

(1) F449 の EV71 感染阻害における牛胎児血清の影響  
低分子化合物 NF449 は、EV71 に結合することによ

り、EV71 の RD 細胞への感染を阻害する。その阻害作用を解析するにあたり、細胞培養液に含まれる牛胎児血清 (FBS) の NF449 による EV71 感染阻害効果への影響を解析した。<sup>35</sup>S でラベルした EV71-1095 株の RD 細胞への結合は、5  $\mu$ M の NF449 で無血清下では効率よく阻害されたが、10% FBS 存在下ではほとんど阻害されなかった。FBS に含まれる因子が NF449 に結合することで EV71 感染阻害効果が低下すると考えられた。

[西村順裕、清水博之、Jeffrey M. Bergelson (フィラデルフィア小児病院) ]

#### (2) NF449 のウイルス感染阻害作用の EV71 特異性

NF449 が EV71 に特異的に作用することを確認するため、<sup>35</sup>S でラベルしたコクサッキーウイルス B3 (CVB3-S35; EV71 と同じエンテロウイルス属) を作製した。CVB3-S35 は RD 細胞に結合し、その結合は CVB3 の受容体 (DAF) に対する抗体で阻害されることを確認した。一方、CVB3-S35 を NF449 (80  $\mu$ M) で前処理しても、RD 細胞への結合は全く阻害されなかった。したがって、NF449 のウイルス感染阻害作用は EV71 に特異的であり、非特異的なウイルス粒子の破壊などではないことが確認できた。

[西村順裕、清水博之、Jeffrey M. Bergelson (フィラデルフィア小児病院) ]

#### (3) NF449 に類似した市販低分子化合物による EV71 の RD 細胞結合阻害効果

NF449 は Suramin 誘導体であり、8つの硫酸基をもっている。その他の Suramin 誘導体 (NF023, NF110, NF157, NF279, NF340) や硫酸基を多数もつ分子 (Fondaparinux) について、EV71 感染阻害能を検討した。Fondaparinux は NF449 と同じく 8つの硫酸基をもち、分子量も同程度である。しかし、Fondaparinux は RD 細胞への EV71 結合をほとんど阻害しなかった。つまり、硫酸基の分子内での配置や立体構造が EV71 との結合に重要であると考えられた。前出の化合物のうち、NF449 と同程度以上の阻害効果を示したのは NF110 のみであった。

[西村順裕、清水博之、Jeffrey M. Bergelson (フィラデルフィア小児病院) ]

#### (4) NF449 に類似した市販低分子化合物による EV71 の RD 細胞感染阻害効果

Fondaparinux, Suramin, NF449, NF110 を用いて、EV71 (PSGL-1 結合株) の RD 細胞感染阻害効果を検討した。Fondaparinux は 16  $\mu$ M においてもほとんど阻害しなかった。Suramin の IC<sub>50</sub> は 32~64  $\mu$ M, NF449 は 2~4  $\mu$ M, NF110 は 1  $\mu$ M 以下であった。つまり、PSGL-1 結合性 EV71 の感染阻害においては、NF110 が最も効果的であった。

[西村順裕、清水博之、Jeffrey M. Bergelson (フィラデルフィア小児病院) ]

#### (5) NF110 誘導体による EV71 の RD 細胞結合阻害効果

NF110 をリード化合物として、NM2~16 の新規化合物を合成した。これらの構造は、EV71 結合に重要と予想される硫酸基の位置を変えたり、硫酸基とその結合するベンゼン環の位置関係を変更したり、硫酸基とベンゼン環の数を減らしたりといった特徴をもつ。EV71 の RD 細胞結合阻害能を解析したところ、NF110 と同様以上の EV71 阻害効果を示した NM16 のみであった。NM16 は、硫酸基とベンゼン環の間に酸素原子が挿入され、硫酸化チロシンの側鎖に類似した構造をもっていた。

[西村順裕、清水博之、Jeffrey D. Winkler (ペンシルベニア大学)、Jeffrey M. Bergelson (フィラデルフィア小児病院) ]

#### (6) NM16 による EV71 の Jurkat 細胞感染および結合阻害効果

Suramin, NF449, NF110, NM16 を用いて、EV71 (PSGL-1 結合株) の Jurkat 細胞感染阻害効果を検討した。Suramin では 16  $\mu$ M においても阻害はほとんど見られなかった。NF449 の IC<sub>50</sub> は 4~6  $\mu$ M, NF110 は約 1  $\mu$ M, NM16 は 8~16  $\mu$ M であった。NM16 は RD 細胞への結合阻害において最も効果的であったが、Jurkat 細胞への

感染においては顕著な効果を示さなかった。しかし、無血清状態で Jurkat 細胞への EV71 結合阻害効果を検討したところ、NF449, NF110, NM16 は同程度に結合を阻害した。

[西村順裕、清水博之、Jeffrey D. Winkler (ペンシルベニア大学)、Jeffrey M. Bergelson (フィラデルフィア小児病院)]

#### (7) NM16 による PSGL-1 非結合性 EV71 の RD 細胞感染および結合阻害効果

Suramin, NF449, NF110, NM16 を用いて、EV71 (PSGL-1 非結合株) の RD 細胞感染阻害効果を検討した。Suramin の  $IC_{50}$  は 8~16  $\mu$ M、NF449 は約 1  $\mu$ M、NF110 は約 4  $\mu$ M、NM16 は 4~8  $\mu$ M であった。RD 細胞結合阻害実験においては、NF449 と NM16 の  $IC_{50}$  は 0.05~0.1  $\mu$ M、NF110 は 0.4~0.8  $\mu$ M であった。NF449 をはじめとする Suramin 誘導体は、PSGL-1 非結合性 EV71 の感染および結合も阻害することが明らかとなった。

[西村順裕、清水博之、Jeffrey D. Winkler (ペンシルベニア大学)、Jeffrey M. Bergelson (フィラデルフィア小児病院)]

#### (8) NF449 による EV71 と可溶性受容体の結合阻害

EV71 の受容体として、PSGL-1, SCARB2, ヘパラン硫酸が知られている。これらの受容体と EV71 の結合を NF449 が阻害するかどうか検討した。EV71 と PSGL-1-Fc の結合は、NF449 で濃度依存的に阻害された。しかし、SCARB2-Fc の結合は阻害されなかった。つまり、PSGL-1 と SCARB2 は、EV71 上の異なる領域に結合すると考えられた。一方、ヘパラン硫酸の一種であるヘパリンと EV71 の結合は、NF449 で阻害された。したがって、PSGL-1 とヘパリンは、EV71 上の同じ部位に結合することが予想された。

[西村順裕、清水博之、Jeffrey M. Bergelson (フィラデルフィア小児病院)]

#### (9) NF449 による EV71 と中和抗体の結合阻害

EV71 の中和抗体である MA28-7 の Fab フラグメント

は、EV71 の 5 回転軸周辺に結合することがわかっている。そこで、MA28-7 と EV71 の結合が NF449 で阻害されるかどうかを検討した。予想通り、MA28-7 の結合は NF449 の濃度依存的に阻害された。一方、5 回転軸から離れた VP2 をエピトープとする抗体 10F0 の結合は、NF449 で阻害されなかった。つまり、NF449 による抗体結合阻害は MA28-7 に特異的であり、NF449 と MA28-7 は EV71 上の同じ場所に結合することが考えられた。

[西村順裕、清水博之、Jeffrey M. Bergelson (フィラデルフィア小児病院)]

#### (10) カニクイザル感染モデルにおける PSGL-1 結合性 EV71 と非結合性 EV71 の病原性解析

感染性クローンに由来する PSGL-1 結合 (PB 型) 株と PSGL-1 非結合 (non-PB 型) 株をそれぞれ感染動物モデルであるカニクイザルに接種し EV71 の感染・病原性発現機構について比較解析した。PB 型または non-PB 型 EV71 を感染させたカニクイザルの臨床検体 (直腸拭い液や咽頭拭い液、血清、PBMC) 及び剖検採材を用いて CODEHOP-PCR にてウイルスの検出を行い、陽性サンプルでは VP1 領域のシーケンスを行なった。non-PB 接種群は振戦などの神経症状を示し、直腸拭い液、咽頭拭い液及び血清から高頻度にウイルス及びウイルス遺伝子が検出された。PB 接種群では明らかな神経症状を示さなかったが、感染後期の血清や末梢血単核球 (PBMC)、剖検時の中枢神経系組織からウイルス及びウイルス遺伝子が検出された。どちらの接種群においても、拭い液や血清および中枢神経系を含む各種組織から検出されたウイルスの多くは VP1-98 あるいは VP1-145 にアミノ酸変異を有しており、non-PB 型 (02363-EE) が高頻度に検出された。また中枢神経組織の病理学的解析では non-PB 接種群全頭と PB 接種群のうち中枢神経組織から高頻度にウイルスが検出されたサルにおいて神経細胞の変性・壊死と炎症所見が観察され、その組織病変の程度に明らかな差は見られなかった。



[片岡周子、清水博之、西村順裕、網康至(動物管理室)、鈴木忠樹、小谷治、岩田奈織子、永田典代(感染病理部)]

(11) カニクイザル感染モデルにおけるカプシドアミノ酸変異と病原性

EV71 カプシドタンパク VP1 の 145 番目のアミノ酸 (VP1-145) は、特異的受容体 PSGL-1 との結合性を規定する。EV71 の感染増殖・病原性発現における PSGL-1 受容体の役割を明らかにすることを目的とし、PSGL-1 結合および PSGL-1 非結合 EV71 株を用いたカニクイザル感染実験を行なった。EV71 は感染初期に VP1-145 に強い選択圧を受け、変異適応した VP1-145E を持つウイルスのみが効率よく増殖し、PSGL-1 非依存的に中枢組織に移行した。PSGL-1 非結合 EV71 株 (02363-KE) 接種群に由来する臨床検体では、VP1-98 における多様な quasi-species の存在が認められた。一方、PSGL-1 結合株および非結合株の感染組織中には、quasi-species は、ほとんど認められず、VP1-98/VP1-145E を有する EV71 variant が高頻度に認められた。PSGL-1 結合性 EV71 接種群のサル末梢血単核細胞から VP1-145G ウイルスが検出されたことから、細胞特異的な PSGL-1 依存的増殖の可能性が示唆された。PSGL-1 結合性 EV71 接種群のサル末梢血単核細胞検体では、同一の検体から VP1-145G および VP1-145E が検出され quasi-species の存在が認められた。以上の結果より、非ヒト霊長類感染モデルにおける VP1-145 アミノ酸変異による多様性が、組織特異性、ウイルス適応性、および病原性に関与する事を明らかにした。

[片岡周子、清水博之、西村順裕、網康至(動物管理室)、鈴木忠樹、小谷治、岩田奈織子、永田典代(感染病理部)]

(12) EV71 感染カニクイザルにおけるサイトカイン誘導

ヒト手足口病重症例では、血中の IFN- $\gamma$ 、IL-6、TNF $\alpha$  等の pro-inflammatory cytokine が、軽症例と

比較して高いことが報告されている。PSGL-1 結合性 EV71 と非結合性 EV71 を用いたカニクイザル感染モデルにおいて、血清中における 28 種類のサイトカイン量を測定した。IL-1 $\beta$  および TNF- $\alpha$  は PB 接種群及び non-PB 接種群どちらのサルにおいても感染 3 日目から上昇していた。G-CSF、IL-1RA、とくに IFN- $\gamma$  は non-PB 接種群において優位に上昇していたが、PB 接種群では顕著な変化はみられなかった。

[片岡周子、清水博之、西村順裕、網康至(動物管理室)、鈴木忠樹、小谷治、岩田奈織子、永田典代(感染病理部)]

(13) 北部ベトナムにおける手足口病の疫学とウイルス遺伝子解析

ベトナムでは、近年、死亡例・重症例を含む手足口病あるいはエンテロウイルス 71 (EV71) 感染症の流行が報告されている。2011-2012 年には、ベトナム全土で、死亡例を含む多くの重症例を伴う大規模な手足口病流行が発生し、公衆衛生上の大きな問題となっている。本研究では、主として、2011 年と 2012 年の北部ベトナムにおける手足口病流行について、手足口病患者検体と疫学情報を用いて EV71 の分子疫学解析を行った。エンテロウイルス陽性症例の約半数から EV71 が検出され、その他のエンテロウイルスの中ではコクサッキーウイルス A6 型およびコクサッキーウイルス A16 型が比較的多く検出された。2011~2012 年の EV71 株の分子疫学的解析を行ったところ、EV71 サブジェノグループは B5、C4、C5 であり、主な流行株は C4 であった。2012 年には B5 の検出率が上昇した。重症 EV71 感染症の流行が断続的に発生しているベトナムでは、手足口病関連エンテロウイルスの病原体サーベイランスは引き続き重要であり、EV71 遺伝子型の推移と重症例を含む手足口病流行との関連について、今後も解析が必要である。

[片岡周子、中村朋史、清水博之、Tran Thi Nguyen Hoa、Nguyen Thi Hien Thanh (NIHE)]

(14) エンテロウイルス71抗血清国際標準品樹立のための国際共同研究

近年、東アジア地域を中心とした地域で、重症中枢神経合併症を伴う大規模な手足口病流行が発生し、小児の重症例・死亡例が多発したことから、公衆衛生上大きな問題となっている。手足口病重症例の主要な原因ウイルスは、EV71であることから、アジア諸国では現在、EV71ワクチン開発が積極的に進められている。とくに中国で開発中の不活化EV71ワクチンは、大規模臨床試験で、優れた有効性・安全性が認められ、市場への導入が検討されている。不活化EV71ワクチンの品質管理およびEV71血清疫学解析の国際的標準化のために、EV71中和試験に用いるエンテロウイルス71抗血清国際標準品の樹立が必要とされている。そのため、The WHO collaborative study to establish the 1st International Standard for anti-EV71 serum に参加し、NIBSCから提供される13種類の抗血清(ヒトプール血清等)のEV71中和抗体価測定を実施する。  
[西村順裕、片岡周子、中村朋史、清水博之]

(15) 2008-2012 に中国山東省にて環境水サーベイランスにて検出されたエンテロウイルスについて

2008年以来、中国山東省 CDC と、環境サーベイランス共同研究を行っている。今般 2008-2012 年に山東省の2市の下水採水地点から分離されたエンテロウイルスの種類について取りまとめを行った。その結果1007株のエンテロウイルスが得られ19種類の血清型に分類された。検出頻度は多いものからE6, E11, CB3, E3, E12, E7の順であった。病原体定点サーベイランスが未確立の中国において、継続的な調査により環境水を調べることでエンテロウイルスの流行状況について多くの知見を得ることができた。  
[Wang Haiyang, Tao Zexin (山東省 CDC)、Zhang Yong (中国 CDC)、吉田弘]

(16) Saffold virus 全遺伝子によるゲノム遺伝子組換え解析

パキスタン・アフガニスタンの急性弛緩性麻痺患者

由来糞便 943 検体から直接 Saffold virus 遺伝子を増幅し、遺伝子解析を行ったところ、71 検体が SAFV 陽性であり、新たに同定された3つの遺伝子型を含む多様な遺伝子型(11 genotypes)の Saffold virus の存在が明らかとなった。すべての遺伝子型の代表株について、全ゲノム遺伝子解析を行ったところ、Saffold virus 非カプシド領域において頻繁かつ広範に遺伝子組換えが起きていることが示唆された。一方、齧歯類を宿主とするカルジオウイルスと Saffold virus 間の遺伝子組換えの可能性は低く、Saffold virus は従来のカルジオウイルスとは固有のヒトカルジオウイルスとして、独立したウイルス種(species)に分類されることが示唆された。

[Naeem Asif、清水博之]

(17) サフォードウイルスの病理学的診断法に関する研究

Saffold virus はまれに髄膜炎や急性弛緩性麻痺患者から検出される。我々はこのウイルスの病原性を明らかにすることを目的として、無菌性髄膜炎由来あるいは上気道炎由来の分離株を非ヒト霊長類であるカンクイザルに対し静脈内接種し、その病態・病理像を検討した。その結果、いずれの分離株接種群においても中和抗体価の上昇を示した。また、上気道炎由来株接種群では、接種後の血液、咽頭・直腸拭い液でウイルスゲノムが陽性となり、一過性の後肢の握力低下を示した。これらの個体の接種10日目の病理解析では、一部の個体で軽度の髄膜炎所見が観察され、弱い神経病原性を有すると考えられた。しかしながら、ウイルス増殖による病態発現の直接的な証明には至らなかった。

[小谷治、永田典代(感染病理部)、清水博之]

(18) ウイルス性髄膜炎の病理学的診断法に関する研究

髄膜炎の原因として知られている主なピコルナウイルスの参照標本作製し、免疫組織化学法による各種抗体の交差反応性について検討し、ホルマリン固定標

本パラフィン包埋切片における SAFV3 および各種エンテロウイルス抗原を検出するシステムを確立した。抗 SAFV 抗体は特異性を示し、エンテロウイルス A 型、B 型に交差反応性は示さなかった。抗 EV71 抗体はエンテロウイルス A 型、B 型に交差反応性を示した。抗 PV 抗体はいずれのウイルスにも交差反応性を示さなかった。抗 CVB3 抗体はエンテロウイルス A, B 型に交差反応性を示した。抗 EV-2C 抗体は SAFV 以外のエンテロウイルス抗原を検出することが可能であった。

[小谷治、永田典代(感染病理部)、清水博之]

#### (19) 劇症型新生児心筋炎を惹起したコクサッキーウイルス B2 型の性状解析

2013 年に相次いで発生したコクサッキーウイルス B2 型 (CVB2) 周産期垂直感染による劇症型新生児心筋炎患者より分離されたウイルスの性状について比較解析を行った。ゲノム全長の遺伝子解析により、これらの CVB2 は構造タンパク質領域が CVB2、非構造タンパク質領域が他のエンテロウイルス B に属するウイルスとのキメラウイルスである可能性が強く示唆された。心筋炎患者から採取した臓器内のウイルス量を比較したところ、肺の CVB2 量は検出限界値未満であったのに対し、心筋内には他の臓器の 7 万倍以上もの CVB2 が存在した。本分離株が心臓に対するトロピズムを有する可能性が考えられた。Plaque size、アポトーシスへの関与が示唆されている 2Apro にそれぞれの *in vitro* ウイルス増殖性状を反映する可能性のあるアミノ酸置換を伴う塩基置換が認められた。乳呑みマウスにおける致死効果について調べたところ、劇症型心筋由来ウイルスが最も強い病原性を示し、他の分離株も各ウイルスを分離した患者の病態を反映する傾向が認められた。

[吾郷 昌信 (長崎県環境保健研究センター)、清水博之]

#### (20) ヒトパレコウイルス 3 型感染症の早期乳児例の検討

ヒトパレコウイルス 3 型 (Human parechovirus type 3; HPeV3) は新生児、早期乳児に感染し発熱、頻脈、網状チアノーゼ等の敗血症様症状を呈するウイルスで、2008 年、2011 年に全国的に流行し、本年 7 月にも新潟県等で流行が報告されたが、過去に道内で流行の報告はない。2014 年 8~9 月に生後 3 カ月未満の発熱児のウイルス検査を施行し、3 例で HPeV3 感染を確認した。2014 年は、2011 年以来のパレコウイルス感染症の全国的な流行が発生し、重症例を含む乳幼児から HPeV3 が検出された。

[本庄 遼太、廣瀬 三恵子、藤田 祥二、阿部 修司(函館五稜郭病院)、中村朋史、清水博之]

#### (21) 埼玉県西部地域で 2014 年に検出されたヒトパレコウイルス 3 型

2014 年日本各地でヒトパレコウイルス (Human Parechovirus, HPeV) 3 型の流行が報告された。埼玉県西部地域においても例外でなく、特に新生児で HPeV 感染を疑う重症例が多く入院となった。疑い症例の髄液、咽頭拭い液、血清、および直腸拭い液から HPeV 5' UTR 領域および VP1 領域の RT-PCR 法を施行し、5' UTR PCR 法陽性検体のウイルス分離を試みた。疑い症例 6 名のうち 4 名の検体で 5' UTR 領域 PCR 法陽性となり、うち 3 名の検体の VP1 領域塩基配列から HPeV3 と同定した。2 名の咽頭拭い液、直腸拭い液から HPeV3 が分離された。VP1 領域 650bp の系統樹解析では 2008 年山形で分離された株と近縁であることが判明した。

[町田早苗(埼玉医大)、清水博之]

#### 6. 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

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。2014 年 12 月に公開されたポリオウイルス病

原体管理に関する新たな WHO 行動指針(GAP III-2014)の内容を検討したところ、2 型ポリオウイルス(野生株、ワクチン株)に特化した病原体管理の必要性等、前バージョンの WHO 行動指針(GAP II-2004)と異なる点も多いことが明らかとなった。2 型ポリオウイルスに特化した病原体管理は、ポリオ根絶最終戦略計画 2013-2018 による bivalent OPV の世界的導入に対応した病原体管理である。GAP III の内容を広く周知するとともに、我が国でも速やかに、あらたな WHO 行動指針(GAP III-2014)に対応したポリオウイルス病原体管理を進める必要がある。

[伊木繁雄(バイオセーフティ管理室)、清水博之]

#### (2) WHO ポリオ実験室ネットワーク DVD を用いたバイオセーフティ教育訓練

WHO本部ポリオ実験室ネットワーク事務局で作成したポリオ実験室バイオセーフティ教育訓練用DVDを、外国人研修生に対するバイオセーフティ教育訓練に使用した。WHOポリオ実験室教育訓練DVDは、実験室のバイオセーフティ、機器の維持管理、バイオセーフティ以外の実験室安全管理、実験室のアレンジメント等、実験室・検査室の運用・安全管理・教育訓練に関する具体的な事例が取り上げられており、病原体を取扱う実験室の安全管理の全体像を理解するうえで有用な教育訓練資料である。地方衛生研究所スタッフを対象とした国内研修、および、外国人研修生を対象としたJICA集団研修において、WHOバイオセーフティ教育訓練用DVDを用いたバイオセーフティ教育訓練を実施した。WHOポリオ実験室教育訓練DVDは、国際的に標準化されたバイオセーフティ教育訓練資料のひとつとして、ポリオ実験室のみならず、臨床検体や病原体を取扱う国内外の実験室・検査室における教育研修への活用が期待できる。

[伊木繁雄(バイオセーフティ管理室)、清水博之]

#### 7. その他

平成 26 年度は 3 件の行政検査依頼があり、型内株鑑別試験等を実施した。型内鑑別試験を行ったポリオ

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) 2014 年の A 型肝炎流行状況の分子疫学的解析

2014 年は第 8 週から A 型肝炎の報告が全国で急増し、最終的には 432 例が報告され、近年では最も患者発生数の多い年となった。合計 159 株の解析を行ったところ、IA が 137 株、IB が 4 株、IIIA が 18 株であった。2014 年の A 型肝炎の多発は、2 月上旬から仙台市を中心とする genotype IIIA の集団発生事例からはじまったが、本事例は宮城、山形に局限して収束し、その後 IA が主要な genotype となった。

[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 31 地方衛生研究所との共同研究]

###### (2) 2014 年に全国で流行した HAV 株の解析

2 月中旬から全国(宮城から鹿児島まで)で広範囲に渡り A 型肝炎の発生が報告され、この株は genotype IA であり、配列解析を行った株で構造/非構造 junction 領域の配列 619 塩基はほぼ完全に一致した。また、藤沢と鹿児島の 2 株で全長配列の決定を行ったところ、7,407 塩基中違いは 1 塩基のみと、非常に均一性が高かった。この 2014 広域株による患者発生報告は第 9 週をピークとした一峰性であり、何らかの同一の感染源が短期間に全国に拡散したものと推測される。

[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 31 地方衛生研究所との共同研究]

###### (3) スリランカにおける A 型肝炎流行の調査

2009 年および 2010 年に発生したスリランカの A 型肝炎流行について、これまでの疫学的解析に加え、遺伝子型による病態の違いについて検討を行った。全

218 検体中、遺伝子型がわかったのは IA 型 116 検体、IIIA 型 48 検体であった。それぞれのカルテから黄疸、倦怠感等の肝炎症状 (18 項目) やアラニンアミノトランスフェラーゼ等の血液生化学的検査の結果 (6 項目) を抽出し、出現率の有意差を検討したところ、白色便と上腹部不快感の 2 項目以外はすべて有意差が認められなかった。白色便以外の胆汁関連項目 (黄疸、血中総ビリルビン) の有意差はなかった。本調査の対象となった患者は 20 代を中心とした本来健康な男性兵士であり、少なくとも彼らの間では遺伝子型別の病態の差は認められなかった。A 型肝炎の病態は遺伝子型ではなく宿主因子によるものが大きいと考えられる。[清原知子、佐藤知子、石井孝司、脇田隆宇、Niroshana Dahanayaka (Rajarata University, Sri Lanka)]

#### (4) 台湾における A 型肝炎流行の調査

台湾における A 型肝炎の流行状況調査を、台湾 CDC と共同で実施した。台湾で 2011 年から 2013 年に報告された A 型肝炎の糞便または血清検体を収集し、HAV ゲノムを抽出し配列解析を行った。解析した 61 株のうち、55 株が IA、2 株が IB、4 株が IIIA であった。IA はさらに複数のクラスターに分けられ、それぞれ東南アジア (フィリピン、インドネシア、タイ) や日本の常在株と思われるクラスターと一致した。また IIIA は韓国の流行株のクラスターに属した。台湾の HAV はさまざまな国から流入していると考えられる。[\*陳婉青、\*楊志元、石井孝司 (\*台湾 CDC) ]

#### (5) 2002 年のタイにおける A 型肝炎集団発生事例の解析

2002 年にバンコク近郊で、飲料水タンクが原因と考えられる A 型肝炎の集団発生事例が報告された。25 名の患者血清が保存されており、HAV ゲノム抽出を行ってウイルス遺伝子配列の解析を行ったところ、すべて同一で東南アジアでは極めて稀な genotype IB であった。[\*Kriengsak Ruchusatwat、\*Chitlada Utaipiboon、\*Chawatesan Namwat、\*Rungreung Kijphati、\*Naiyana Wattanasri、\*Piyani Tharmaphornpilas、\*\*武田直

和、石井孝司 (\*タイ国立予防衛生研究所、\*\*大阪大学微生物病研究所・日本一タイ感染症共同研究センター) ]

#### (6) A 型肝炎ウイルス参照抗原液の値付け

A 型肝炎ワクチン抗原含量試験は当室とワクチン製造所各自で調達した個別の参照抗原液を用いている。ロット更新を機会に参照抗原液を共有し試験精度を上げるため、製造所が作製した次期参照抗原液候補品の値付けを両者共同で行った。試験は共通プロトコールに従って個別に行い、統計解析は品質保証・管理部に依頼した。次期参照抗原液候補品は両者において問題なく使用可能であり、A 型肝炎ウイルス抗原を 0.807  $\mu\text{g/mL}$  含む参照抗原液「RHA1」とした。この抗原液は交付対象ではなく、製造所から購入するものとした。[清原知子、佐藤知子、石井孝司、落合雅樹 (品質保証・管理部)]

## 2. B 型肝炎ウイルス (HBV) に関する研究

### (1) B 型肝炎に対する核酸アナログ感受性の評価

1.4 倍長の HBV コンストラクトを構築し、これを培養細胞に導入する事により HBV の複製を確認した。この系にエンテカビルを投与し、培養細胞内で core 粒子に被覆されている HBV DNA を RTD-PCR およびサザンロット法で定量することでエンテカビル感受性の評価を行った。また、この系を用いてテノホビルに対する感受性評価も試みた。

[山田典栄、杉山隆一、四柳宏 (東京大学)、脇田隆宇、加藤孝宣]

### (2) B 型肝炎エンテカビル耐性症例のアミノ酸配列の検討

エンテカビル投与中に HBV DNA が再上昇した症例の患者血清より HBV 株を分離しそのゲノム配列を確認した。得られた HBV 株には既報のエンテカビル耐性変異は認めなかったが、ラミブジン耐性として知られる rtL180M、rtM204V の変異に加えて、これまでに報告のない N238H、L269I の変異を認めた。これらの変異を有

するクローンはエンテカビル投与開始前はマイナークローンとして存在したが,再上昇時はメジャークローンとして存在した. これらの変異がエンテカビル耐性に関わっていると考えられた.

[山田典栄, 杉山隆一, 四柳宏 (東京大学), 脇田隆宇, 加藤孝宣]

### (3) エンテカビル耐性症例から得られた耐性変異の薬剤感受性評価

エンテカビル投与中に HBVDNA が再上昇した症例の患者血清より得られた rtL180M, rtM204V, N238H, L269I の変異を有する株の複製コンストラクトを作成し, 変異を持たないコンセンサス株のコンストラクトとともに培養細胞に導入し RTD-PCR およびサザンブロット法にてエンテカビル感受性の評価を行った. これらの変異を有する株はコンセンサス株と比較し, エンテカビル感受性が不良でありこれらの変異はエンテカビルに耐性に関わっていることが明らかとなった.

[山田典栄, 杉山隆一, 四柳宏 (東京大学), 脇田隆宇, 加藤孝宣]

### (4) HBV 遺伝子型が宿主細胞のアポトーシスに与える影響の解析

HBV 複製モデルを用い, HBV が宿主細胞のアポトーシス感受性に与える影響を解析した. 遺伝子型が異なる HBV 株を用い, さらに成人での B 型急性肝炎から慢性化した症例から得られた株を含む計 8 株について検討を行った. これらの複製コンストラクトを HepG2 細胞に導入し, その後 TNF- $\alpha$  で処理することでアポトーシスを誘導した. その結果, HBV 陽性細胞ではアポトーシス感受性が亢進していたが, 遺伝子型 Bj 株の導入細胞では高く遺伝子型 A 株の導入細胞では低いアポトーシス感受性を示した. また, 成人での B 型急性肝炎慢性化症例から得られた株の導入細胞では他の株に比べアポトーシス感受性が低下していた. これらのアポトーシス感受性に与える影響の差は, HBV 株が得られた症例の臨床像と関連している可能性が考えられた.

[杉山奈央, 山田典栄, 杉山隆一, 脇田隆宇, 加藤孝

宣]

### (5) RNA Exosome regulation of HBV replication.

Using arrayed shRNA targeting 133 human helicases, we performed a functional screening to identify those who suppress HBV replication. We here report superkiller viralicidal activity 2-like (*S. cerevisiae*) (SKIV2L) RNA helicase dependent mechanism that regulates HBV replication through preferential degradation of HBV-RNA. This mechanism is interferon-independent. RNA immunoprecipitation analysis identified the formation of SKIV2L/HBV-RNA complex, which is regulated by SKIV2L's phosphorylation at serine residues 243 and 245 amino acids, and the further association of this complex with the RNA exosome proteins. The binding between SKIV2L and HBV-RNA was RNA exosome-independent, suggesting that SKIV2L first identifies HBV-RNA then shuttles it to the RNA exosome where it is degraded. SKIV2L also suppresses the Duck HBV (DHBV) but not HCV, suggesting that SKIV2L is a possible common effector molecule against different members of the Hepadnaviridae.

[Hussein H Aly, Takanobu Kato, Takaji Wakita]

### (6) Host factors required for HBV-cccDNA formation.

The final aim of this study is to identify host factors required for HBV cccDNA formation that can be targeted by drugs for HBV treatment. Human helicases play an important role in DNA repair pathways, and may be involved in HBV-cccDNA formation. We first screened for helicases affecting HBV replication using shRNA library targeting 133 human helicase genes. We further identified those who are required for HBV

replication. Based on the reported effect, helicases were then grouped into functional groups, one of which is the Recq helicase group containing (RecqL, and WRN) helicases which plays an important function in DNA repair including mismatch repair, nucleotide excision repair and direct repair. Chromatin immunoprecipitation identified the direct interaction between RecqL helicase and HBV-cccDNA. Further mechanistic analysis is undergoing to analyze the mechanism by which RecqL can regulate HBV replication.

[Hussein H Aly, Takanobu Kato, Takaji Wakita]

#### (7) HBV 侵入を阻害するシクロスポリンおよびその誘導体の抗 HBV 作用機序の解析

シクロスポリンが HBV 感染受容体 NTCP とエンベロープである LHBs の結合を阻害することにより、HBV 感染を阻害することが示唆された。誘導体検索により、HBV 感染を強く阻害するシクロスポリン誘導体を同定した。これらはいずれも免疫抑制作用をもたない化合物であった。

[志村聡美, 渡士幸一, Ann Sluder (SCYNEXIS), Michael Peel (SCYNEXIS), 河合文啓 (横浜市立大), 朴三用 (横浜市立大), 脇田隆宇]

#### (8) 微小管による HBV 複製制御機構の解析

Hep38.7-Tet 細胞を用いた化合物スクリーニングによりノコダゾールが HBV 複製を阻害することが明らかとなった。またコルヒチンやビンブラスチンなどノコダゾール以外の微小管合成阻害剤も同様に HBV 複製を低下させたことより、微小管が HBV 複製を制御することが明らかとなった。

[岩本将士, 渡士幸一, 脇田隆宇]

#### (9) HBV 感染感受性を低下させる Ro41-5253 の作用機序の解析

Ro41-5253 の前処理により NTCP タンパク質発現低下を伴って細胞の HBV 感染感受性が低下することを見出

した。また Ro41-5253 はレチノイン酸受容体転写活性低下により NTCP 遺伝子転写を減少させることが示唆された。

[九十田千子, 渡士幸一, 岩本将士, 脇田隆宇]

#### (10) HBV 感染を阻害する天然化合物の同定

HepG2-hNTCP-C4 細胞を用いて独自の天然化合物ライブラリーより HBV 感染を阻害する化合物を同定した。そのうちのひとつ SF177 は初代ヒト肝細胞において IC50 が  $\mu\text{M}$  オーダー以下の強い抗ウイルス効果を有していた。

[金子学, 渡士幸一, 紙透伸治 (東京理科大), 菅原二三男 (東京理科大), 脇田隆宇]

#### (11) NCTP 以外の entry に関与する宿主因子の同定

HBV の entry に関与する因子として HBV preS1 と結合する NTCP が発見された。一方、HBV S 領域を標的とする酵母で作製した B 型肝炎ウイルスワクチンは抗体獲得率 9.5% (40 歳) で、HBV 感染防御効果も大変高いことが知られている。また、preS1 領域が欠損した HBV の存在が多く報告されており、このようなウイルス感染者からも肝癌発症が報告されている。実際、NTCP 発現 HepG2 細胞を樹立し、HBV を感染させたところ、感染効率は約 50% で、感染しない細胞群が存在した。そこで、我々は NCTP 以外の entry 因子を同定するため、HBV mRNA を標的とする蛍光プローベを細胞に導入することで、生きたまま HBV 感染 HepG2-NTCP 細胞と非感染細胞の分別を行い、それぞれの細胞の性状解析を行っている。

[藤本陽, 青柳東代, 相崎英樹, 脇田隆宇]

#### (12) 創薬スクリーニングのための HBV mRNA 測定系の開発

HBV mRNA を標的とする蛍光プローベを細胞に導入することで、細胞を生かしたまま HBV mRNA 量測定系を開発している。蛍光プローベは培養上清に添加するだけで各種肝細胞に効率良く取り込まれ、細胞毒性も認められなかった。現在、細胞内 mRNA 量と比較検討し

ている。

[藤本陽, 青柳東代, 相崎英樹, 脇田隆字]

### (13) 抗ウイルス薬の標的候補分子の同定

テトラサイクリン誘導 HBV 発現細胞の HepAD38 細胞 (genotype D) からサブクローニングされた Hep38.7-Tet 細胞を用いて、細胞外 HBeAg 量を指標に 3 種類の siRNA Library (DNA damage response、Epigenetic、Nucleic Acid Binding) のスクリーニングを実施した。HBeAg 分泌阻害を示した 80 遺伝子を primary hits として選抜した。さらに再現性評価として、HBeAg 分泌阻害及び cccDNA 合成阻害を示した 21 遺伝子を second hits として選抜した。次に Hirt DNA を精製し cccDNA 量の減少と knockdown 効率の相関を検討した。1 遺伝子が cccDNA 産生に関与している可能性が考えられた。

[木下渉 (JT 医総研), 渡士幸一, 脇田隆字]

### (14) B型肝炎の血清疫学調査 (3)

血清銀行保存検体を用いて小児 (4-9 才) の HBs 抗原保有率を調査したところ 200 件対中 6 検体 (0.3%) が陽性、その中で HBV-DNA が検出されたものは 3 検体で、最終的に 0.15% という結果を得た。しかしながら、この結果は従来の報告と比較して 10 倍ほど高い数値であり、検体数が少ないことによる過大評価バイアスが懸念された。検体数を増やして調査の精度を上げるため、年齢層を拡大し 10-15 才における HBs 抗原保有率を追加調査した。その結果、HB 抗原及び HBV-DNA 陽性は 1000 検体中 2 検体で、4-9 才同様、従来の結果より高い数値となった。過去の調査は B 型肝炎対策を積極的に導入した静岡、宮城、事前スクリーニングで肝臓疾患を除く日赤献血者を対象としたものであり、過小評価バイアスが考えられた。一方、我々の調査は B 型肝炎とも関連の深い肝がん報告数が多い九州地域を含み、総陽性検体 5 検体中 4 検体は福岡、佐賀由来であった。

[清原知子, 石井孝司]

(15) ロットリリースに関する WHO ガイドラインの和訳

海外のワクチン等に対するロットリリース制度の調査に関連して行われた「規制当局によるワクチンのロットリリースに関するガイドライン “Guidelines for Independent Lot Release of Vaccines by Regulatory Authorities, TRS978, Annex2, 2013”」の和訳作業に参加した。

[清原知子, 内藤誠之郎 (品質保証・管理部)]

## 3. C型肝炎ウイルス (HCV) に関する研究

(1) ビタミン D により誘導される抗菌ペプチド LL-37 の抗 HCV 作用の解析

ビタミン D により誘導される抗菌ペプチド, LL-37 による抗 HCV 作用の検討を行った。LL-37 を培養細胞に投与し HCVcc を感染させると HCV の感染増殖が著明に抑制されることわかった。この抗菌ペプチドの HCV ライフサイクルに与える影響を詳細に検討した結果、LL-37 は HCV の感染性粒子を破壊する事でその感染を阻害していると考えられた。

[松村卓哉 (昭和大), 井廻道夫 (新百合ヶ丘総合病院), 椎名正明 (新百合ヶ丘総合病院), 杉山奈央, 村山麻子, 藤田めぐみ, 脇田隆字, 加藤孝宣]

(2) ベロ細胞における HCV 感染・複製の解析

ワクチン製造細胞として実績があるアフリカミドリザル腎臓由来のベロ細胞の HCV 感染・複製能を検討した。ベロ細胞に培養細胞で作製した HCV 粒子を添加したが、HCV 感染細胞は観察されなかった。ベロ細胞に合成 HCV RNA を導入したが、HCV 複製は観察されなかった。ベロ細胞では様々な種類のウイルスが増殖できることが知られているが、HCV は増殖できないことが判明した。

[村山麻子, 杉山奈央, 脇田隆字, 加藤孝宣]

(3) ベロ細胞での HCV 複製を可能にする因子の同定

HCV 複製に重要な宿主因子の一つである miR-122 の発現量は、ベロ細胞では Huh-7.5.1 に比べて低かった。



そこでレンチウイルスベクターを用いてペロ細胞に miR-122 を強制発現させた細胞株を樹立した。その細胞に HCV RNA をトランスフェクションすると、細胞内のコア抗原量は時間経過とともに上昇することから、ペロ細胞に miR-122 を発現させると HCV 複製は可能となった。

[村山麻子, 杉山奈央, 脇田隆字, 加藤孝宣]

#### (4) ペロ細胞における HCV 感染の検討

ペロ細胞において HCV 粒子の感染がみられなかったため、HCV の 4 種類の受容体分子の発現量を調べた。ペロ細胞では CD81, Occludin の発現量は Huh-7.5.1 細胞より高かったが、Claudin-1 と SR-BI の発現量は低かった。さらに、ペロ細胞のそれぞれの受容体分子の配列には Huh-7.5.1 と比較して、異なる箇所があった。そこで、4 種類のヒト HCV 受容体をレンチウイルスベクターで発現させると、ペロ細胞において HCV 感染が観察できるようになった。

[村山麻子, 杉山奈央, 脇田隆字, 加藤孝宣]

#### (5) ペロ細胞における感染性 HCV 粒子産生の検討

ペロ細胞に miR-122 を発現させることにより HCV 複製は可能となったが、感染性ウイルスは産生できなかった。HCV の感染性ウイルス産生に重要な宿主因子である ApoE の発現量は、Huh-7.5.1 細胞に比べてペロ細胞では低かった。そこで、レンチウイルスベクターによりペロ細胞にヒト ApoE を発現させた。miR-122 に加えて ApoE も発現させたペロ細胞では、HCV RNA 導入後に感染性ウイルスの産生が可能となった。

[村山麻子, 杉山奈央, 脇田隆字, 加藤孝宣]

#### (6) IFN 治療著効判定 9 年後に HCV 陽性と診断された症例の HCV 塩基配列の検討

C 型慢性肝炎に対し Peg-IFN・リバビリン併用療法を行い、HCV RNA 定性検査を用いた評価で SVR と判定されたが約 9 年後に HCV RNA 陽性となった症例を解析した。治療開始前と 9 年後 HCV RNA 検出時の血清から HCV 株を分離し、ウイルスゲノムの塩基配列の相同性につ

いて検討を行った。得られた HCV 株は 98.9%の相同性を持ち、分子系統樹による解析でも近縁に位置したため、この症例は新規 HCV 株の再感染ではないと考えられた。

[山田典栄, 小林稔(清川病院), 安田清美(清川病院), 奥瀬千晃(聖マリアンナ医大), 鈴木通博(聖マリアンナ医大), 四柳宏(東京大学), 脇田隆字, 加藤孝宣]

#### (7) 臨床検体を用いた HCV RNA 検出系の評価

HCV RNA 定性検査で陰性と診断された保存血清を用いて、より高感度な HCV 検出系であるリアルタイム PCR 法 (アキュジーン m-HCV ; アボットジャパン) を用いて再測定を行った。その結果、IFN 治療終了後、1 週後、3 週後、10 週後、24 週後は HCV RNA 定性検査では陰性と判定されたが、リアルタイム PCR 法では 24 週後の血清において陽性と判定された。C 型慢性肝炎治療後の経過観察には高感度検出系による HCV RNA の定期的な検査が重要であることが示唆された。

[山田典栄, 小林稔(清川病院), 安田清美(清川病院), 奥瀬千晃(聖マリアンナ医大), 鈴木通博(聖マリアンナ医大), 四柳宏(東京大学), 脇田隆字, 加藤孝宣]

#### (8) NS5A 阻害剤耐性変異株の特徴に関する検討

DAA 剤の登場により IFN-free 治療を含む様々な治療法が確立され、C 型慢性肝炎に対する標準治療が変化してきた。その中で NS5A 阻害剤は強い抗 HCV 作用を持つ一方、耐性変異によってその効果が減弱するため、耐性変異株を有する患者に対する治療戦略の確立が課題となっている。そこで、HCV JFH-1 キメラウイルスの感染培養系を用いて、NS5A 阻害剤に対する耐性変異が HCV のライフサイクルに与える影響を検討した。その結果、NS5A 阻害剤耐性にかかわる Y93H 変異を含む株では感染力価が亢進していることが明らかとなった。

[新田沙由梨, 杉山奈央, 脇田隆字, 加藤孝宣]

#### (9) NS5A 阻害剤耐性変異株の抗 HCV 薬感受性に関する検討

NS5A 阻害剤に対する耐性変異株に有効な薬剤の同定を目的として検討を行った。耐性変異を導入したキメラウイルスを導入した培養細胞を各種抗 HCV 剤で処理を行い、細胞内 Core 抗原量を測定することで耐性変異株に有効な薬剤の同定を試みた。その結果、IFN-製剤や Ribavirin ではその阻害活性に差を認めなかったが、第二世代プロテアーゼ阻害剤である Simeprevir と Asunaprevir では Y93H 変異を持つウイルスに対してより強い阻害活性を示した。従って NS5A 阻害剤に対する耐性変異を含むウイルスは第二世代プロテアーゼ阻害剤に感受性であると考えられ、変異株を有する患者に対してはこれらの薬剤を含む治療が選択肢の一つとなり得ると考えられた。

[新田沙由梨, 杉山奈央, 脇田隆字, 加藤孝宣]

(10) HCV コア領域のアミノ酸変異が IFN 感受性に与える影響の評価

構造領域が HCV Genotype 1b 由来、非構造領域が 2a 由来のキメラウイルスを作成し、HCV コア領域のアミノ酸変異が IFN 感受性に与える影響の評価を行った。このキメラウイルスに IFN の感受性に関わることが報告されている aa 70 (R/Q) と aa 91 (L/M) の変異を導入し (TH/JFH1-RL, -RM, -QL, -QM), IFN 感受性に与える影響を検討した。これらの HCV 株の全長 RNA をそれぞれ Huh7.5.1 細胞に導入した後、IFN- $\alpha$  を添加し HCV core 抗原量の変化を測定したところ、いずれの変異株でも HCV core 抗原量が低下し、変異による IFN 感受性に差は見られなかった。しかし IFN により宿主細胞表面に発現誘導される MHC Class I を Flow Cytometry を用いて測定したところ、QL 株、QM 株で細胞表面の MHC class I の発現量が低く抑えられ、Core 領域 70 番アミノ酸に変異を有するウイルスは、宿主細胞内に蓄積し抗原提示能を抑制することで宿主リンパ球による細胞障害を逃れ、IFN 治療に対して抵抗性を獲得するものと考えられた。

[藤田めぐみ, 杉山奈央, Eui-Cheol Shin (韓国 KAIST), Wonseok Kang (韓国 KAIST), 脇田隆字, 加藤孝宣]

(11) HCV NS5A-ISDR アミノ酸変異が HCV 増殖に与える影響の解析

HCV の NS5A に存在する IFN 感受性領域 (ISDR) のアミノ酸変異は、IFN 治療における治療効果の予測因子として知られている。そこで、JFH-1 株を用いた培養細胞系を用い、ISDR のアミノ酸変異が HCV の増殖に与える影響を検討した。HCV JFH-1 株の NS5A を Genotype 1b 株に置換したキメラウイルス (JFH1/5ACon1) を用い、さらに、NS5A の ISDR を wt に置換した i-wt 株および、ISDR に 7 つのアミノ酸変異を持つ i-7mut 株を作製した。これらのコンストラクトを用い、ISDR の変異が HCV ライフサイクルの各ステップに与える影響を評価した。これらの株の HCV 全長 RNA の導入により細胞内の core 抗原量には差は認めなかったが、上清中の core 抗原量は i-7mut でのみ低値であり、この株では感染性粒子生成効率が低下していると考えられた。

[杉山隆一, 杉山奈央, 村山麻子, 藤田めぐみ, 山田典栄, 脇田隆字, 加藤孝宣]

(12) HCV NS5A タンパク質のリン酸化に関与するプロテインキナーゼの探索

HCV NS5A タンパク質のリン酸化はウイルス生活環の制御に重要であるが、そのリン酸化機構の詳細は十分に解析されていない。本研究では、NS5A タンパク質のリン酸化に関与するプロテインキナーゼの同定を目的とした。AlphaScreen 法を用いて 404 種類のヒトプロテインキナーゼから NS5A タンパク質との相互作用が強い 79 種類のキナーゼを同定した。そのうち 9 種類に *in vitro* での強いリン酸化活性を認めた。HCV 培養細胞系を用いたノックダウン実験により、これらの中から HCV 粒子形成過程の制御に関与する casein kinase I- $\alpha$  (CKI- $\alpha$ ) を同定した。さらに、CKI- $\alpha$  によりリン酸化される NS5A 領域を同定した。

[政木隆博, 加藤孝宣, 脇田隆字, 鈴木哲朗 (浜松医大)]

(13) microRNA-122 (miR-122) による HCV ゲノム複製の新規制御機構

HCV RNA と miR-122 の結合は宿主 XRN1 のエキソヌクレアーゼ活性から HCV RNA を保護し安定化することにより HCV 複製の増強作用に貢献する。しかし、この増強作用は XRN1 ノックダウン後にも認められることから、miR-122 は HCV 複製に対してゲノム RNA の安定化以外にも作用を有することが示唆される。今回、XRN1 ノックダウン細胞を用いて miR-122 の抗 XRN1 作用非依存的な HCV 複製制御機構を明らかにした。さらに、ポリソーム解析により miR-122 はウイルスゲノム RNA の可用性を翻訳から RNA 合成に移行することで直接的に HCV 複製を刺激することが示唆された。

[政木隆博, 加藤孝宣, 脇田隆字, Stanley Lemon (米国ノースカロライナ大学) ]

#### (14) HCV 感染による宿主 microRNA 機能の抑制

HCV 複製は miR-122 機能に大きく依存しているため、HCV 感染細胞内では宿主標的遺伝子に対する miR-122 機能が障害されている可能性がある。今回、miR-122 により負に制御される複数の宿主細胞性因子の遺伝子発現が HCV 感染後に増加することをマイクロアレイ、RT-qPCR、ルシフェラーゼレポータープラスミドを用いた解析で明らかにした。それらの中には肝発癌に関わる遺伝子も含まれており、HCV による肝発癌機序の新たな知見として期待される。

[政木隆博, 脇田隆字, 加藤孝宣]

#### (15) HCV 感染における宿主 microRNA 発現の解析

HCV 感染、非感染細胞における宿主 microRNA 発現をマイクロアレイで比較解析した。解析した 2,006 種類の microRNA のうち 193 種類が感染 Huh7.5.1 細胞で発現していた。そのうち、158 種類の発現が感染に伴い上昇（うち 15 種類が 2 倍以上の上昇）、34 種類の発現が低下（うち 3 種類が 2 倍以上の低下）していた。現在、HCV 感染に伴い発現変化のみられた microRNA に着目し、それらの microRNA が HCV の生活環に及ぼす影響を解析している。

[政木隆博, 脇田隆字, 加藤孝宣]

#### (16) HCV infection of B lymphocytes.

We aimed to clarify the susceptibility of primary B-cells to HCV infection, and to study its functional effect. In this study, we found that the recombinant HCV J6JFH1 strain could infect human B-cells isolated from the peripheral blood of normal volunteers by the detection of both HCV-negative-strand RNA by reverse transcription polymerase chain reaction, and NS5A protein. We also show the blocking of HCV replication by type I interferon after B-cell HCV infection. Although HCV replication in B-lymphocytes showed lower efficiency, in comparison with hepatocyte line (Huh7) cells, our results clearly demonstrate that human B-lymphocytes without other non-B-cells can actually be infected with HCV, and that this interaction leads to the induction of B-cells' innate immune response, and change the response of these cells to apoptosis.

[Nakai M, Seya T, Matsumoto M, Sakamoto N (Hokkaido Univ.), Shimotohno K (National Center for Global Health and Medicine), Aly HH.]

#### (17) シクロフィリン阻害剤のインターフェロン経路への影響に関する解析

シクロフィリン阻害剤処理により PKR の活性化が抑制されること、これによりインターフェロン (IFN) 情報伝達経路下流遺伝子の IFN stimulated genes のタンパク質発現が誘導されることが観察された。またシクロフィリン A は PKR と相互作用し、PKR の活性化およびそれに引き続いておこる stress granules 形成を制御していると考えられた。

[大東卓史, 渡士幸一, 志村聡美, Ann Sluder (SCYNEXIS), Katyna Borroto-Esoda (SCYNEXIS), 脇田隆字]

#### (18) 感染性 HCV 粒子産生を抑制する天然化合物生理活性の同定

真菌抽出物より単離されたネオエキヌリン B が HCV 感染を阻害することが見出された。これは HCV 生活環のうち特に HCV のゲノム複製ステップを阻害していること、これは肝臓 X 受容体を標的としていることを見出した。

[中嶋翔, 渡士幸一, 紙透伸治 (東京理科大), 菅原二三男 (東京理科大), 脇田隆字]

(19) フルタミドによる感染性 HCV 産生低下機構の解析

フルタミドが感染性 HCV 粒子形成過程を阻害することが示唆された。またフルタミドは肝細胞内の脂肪滴量を減少させることが観察された。

[大橋啓史, 渡士幸一, 脇田隆字]

(20) C 型肝炎ウイルス中和エピトープを有する日本脳炎ウイルス様粒子の作製

日本脳炎ウイルス (JEV) E タンパク質の粒子表面に露出すると予想される部位に HCV E2 由来中和エピトープを挿入し、JEV 様粒子 (SVP) の分泌が阻害されない部位を 3ヶ所同定した。3ヶ所に同時にエピトープを挿入しても粒子が分泌された。挿入されたエピトープが粒子表面上に提示されている事を、蛍光相関分光法を用いて確認した。さらに HCV 中和エピトープを有する JEV SVP (SVP-E2) を恒常的に発現する 293T 細胞を樹立し、培養上清から粒子を精製した。

[嵯峨涼平, 松田麻未, 長谷川慎 (長浜バイオ大), 加藤孝宣, 中村紀子 (東レ医薬研), 小西英二 (阪大微研), 竹山春子 (早大院), 鈴木亮介, 脇田隆字]

(21) C 型肝炎ウイルス中和エピトープを有する日本脳炎ウイルス様粒子による中和抗体の誘導

培養上清から精製した HCV 中和エピトープを有する日本脳炎ウイルス様粒子 (SVP-E2) をマウスの腹腔に免疫した。SVP-E2 免疫マウスの血清は JEV および遺伝子型 1b, 2a および 3a 由来 HCV に対する感染中和能を示したことから、外来エピトープ挿入 JEV SVP は JEV および他の病原体に対して効率良く中和抗体を誘導する二価ワクチン抗原としての可能性が示唆された。

[嵯峨涼平, 藤本陽, 渡邊則幸, 松田麻未, 長谷川慎 (長浜バイオ大), 加藤孝宣, 中村紀子 (東レ医薬研), 小西英二 (阪大微研), 田島茂 (ウイルス第一部), 高崎智彦 (ウイルス第一部), 竹山春子 (早大院), 鈴木亮介, 脇田隆字]

(22) 細胞内発現抗体による C 型肝炎ウイルスコア蛋白質発現による NF- $\kappa$ B シグナル活性化の抑制

C 型肝炎ウイルス (HCV) のコア蛋白質に対する抗体の H 鎖および L 鎖の可変部遺伝子をクローニングし、発現プラスミドを作製した。細胞内で発現させた単鎖可変部 (イントラボディ) は、コア蛋白質との結合が認められ、また一部のイントラボディは HCV の増殖を顕著に抑制した。またこれらのイントラボディは、コア蛋白質の発現によって活性化される NF- $\kappa$ B シグナルに対しても抑制効果を示した。

[鈴木亮介, 斎藤憲司, 松田麻未, 佐藤充 (農業生物資源研), 鐘ヶ江裕美 (東大医科研), 千葉丈 (東京理科大), 斎藤泉 (東大医科研), 脇田隆字, 鈴木哲朗 (浜松医大)]

(23) HCV 感染に伴う細胞の代謝変化の解析

HCV 感染に伴う細胞内代謝の変化を理解するため、代謝物質の網羅的解析 (メタボロミクス) を行った。HCV 感染により、TCA 回路、プリン・ピリミジン合成系など蛋白核酸合成等は低下し、ATP、GTP、phosphocreatine 等のエネルギー供与体は減少し、一方解糖系は著名に亢進していた。HCV 感染がどのようなメカニズムで宿主代謝に影響を与えているか解析を進めている。

[藤本陽, 松田麻未, 相崎英樹, 鈴木哲朗 (浜松医科大学), 脇田隆字]

(24) HCV 感染が宿主細胞のリポ蛋白の代謝に与える影響

HCV 感染による肝脂肪化の原因のひとつとして、超低比重リポ蛋白 (VLDL) 分泌低下が報告されている。一方、VLDL は HCV の感染性に必須と報告されており、これらの矛盾点を解明するため生体での脂質輸送の中心を担っているリポ蛋白を解析した。HCV 感染後、培養

上清中の VLDL が増加し、低比重リポ蛋白 (LDL) が低下することを見出し、その原因として HCV 感染細胞での VLDL 分解酵素である Hepatic lipase (HL) の発現低下を見出した。HL を過剰発現させた Huh-7 細胞に HCV を感染させた後、培養上清中 HCV の感染価を測定したところ、著しい感染価の低下が見られた。また、HCV 感染直後には一時的に HL 発現発現が見られるものの、感染後時間経過的に HL 発現が低下した。このことから、抗ウイルス応答としての HL 発現上昇が HCV により抑制され、感染性の維持に都合の良い環境を作り出している可能性が示唆された。

[藤本陽, 相崎英樹, 脇田隆字]

#### (25) HCV に対する抗ウイルス治療後、SVR 後の病態に関する研究

C 型慢性肝炎に対する治療は IFN/DAA の治療で 9 割以上の患者に SVR が期待できる。しかしながら、発癌リスクの高い線維化進展例や高齢者の多くが SVR となる一方、IFN と異なり DAA の肝発癌抑制作用については不明であり、今後 SVR 後の肝障害や発癌が増加することが懸念される。そこで、今後増加する SVR 後症例の肝障害・肝発癌のリスク評価と抑制法の開発のため、SVR 後の肝病態の解明と新たな検査系・対処法の確立を目指す。

[青柳東代, 相崎英樹, 小池和彦 (東京大学)、平松直樹 (大阪大学)、黒崎雅之 (武蔵野赤十字病院)、林和彦 (名古屋大学)、飯島尋子 (兵庫医科大学)、坪田昭人 (東京慈恵会医科大学)、鈴木哲朗 (浜松医科大学)、考藤達哉 (国立国際医療研究センター)、丸澤宏之 (京都大学)、福原崇介 (大阪大学)、和氣健二郎 (ミノファーマ製薬)、市野瀬志津子 (東京医科歯科大学)、脇田隆字]

#### (26) HCV 感染に伴う細胞微細構造変化の解析

HCV 感染に伴う肝組織の微細構造変化については多くの報告があるものの統一的な判断基準はない。そこで、我々は HCV 感染細胞系を用いて、感染細胞で観察される特徴的な所見に注目し、HCV 慢性肝炎患者の肝

臓生体検査サンプルを電子顕微鏡で観察し、オルガネラの変化を調べている。さらに、同様なオルガネラ変化が SVR 後の症例の肝生検でも観察された。

[青柳東代, 松田麻未, 市野瀬志津子 (東京医科歯科大)、和氣健二郎 (ミノファーマ製薬)、相崎英樹, 脇田隆字]

#### (27) HCV 生活環に関与する HCV-NS4B 結合膜蛋白の同定と解析

NS4B 発現細胞から pull-down 法により NS4B に結合する膜蛋白を精製し、プロテオーム解析、siRNA screening を行ったところ、複製過程に関与するタンパクとして PREB および SURF4 を見出した。PREB、SURF4 は複製複合体を含む HCV 特有の膜構造物形成に重要な役割を果たしてもものと考えられた。さらに、PREB、SURF4 はポリオウイルスの複製にも重要な役割を果たしていることを見出した。

[Lingbao Kong (江西農業大学)、山越智 (生物活性物質部)、鈴木哲朗 (浜松医科大学)、相崎英樹, 脇田隆字]

#### (28) スフィンゴ脂質の HCV 複製複合体を含む小胞形成における役割の解析

スフィンゴ脂質合成阻害剤により、HCV 複製が抑制されることを見出した。スフィンゴ脂質が DMV 形成にどのように関わっているか解析する。

[イード ホッサム, 深澤征義 (細胞化学部)、花田賢太郎 (細胞化学部)、相崎英樹, 脇田隆字]

#### (29) HCV 生活環に関与する HCV-NS5A 結合膜蛋白の同定と解析

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、siRNA screening を行ったところ、翻訳、複製過程に関与するタンパクとして ELAVL1 を見出した。HCV RNA と結合する ELAVL1 は NS タンパク質と結合の有無により、HCV 翻訳・複製を調整しているものと考えられる。

[後藤耕司 (東大感染症内科)、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(浜松医科大学), 相崎英樹, 脇田隆字]

### (30) HCV 感染に伴う核膜孔変化の解析

電顕観察により、HCV 感染に伴い核膜孔の増加が観察された。そのメカニズムとウイルス産生に与える影響を調べるため、NS4B, NS5A 発現細胞から pull-down 法により NS4B, NS5A に結合する核膜蛋白を同定した。共通する蛋白に着目し、解析を進める。

[青柳東代, 相崎英樹, 山越智(生物活性物質部), 鈴木哲朗(浜松医科大学), 脇田隆字]

### (31) 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、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 HSD を見出した。HSD は NS5A と結合し、HCV 粒子形成の場である脂肪滴へ導くことが示された。さらに、HSD は脂肪滴の産生にも影響を与えることが判明した。

[相崎英樹, 深澤征義(細胞化学部), 花田賢太郎(細胞化学部), 本島清人(明治薬科大学), 鈴木哲朗(浜松医科大学), 脇田隆字]

### (32) 肝星細胞の HCV 感染性の解析

肝星細胞の活性化が肝線維化と密接に関連していることから、HCV が肝星細胞に感染増殖するかを明らかにすることは重要な課題である。HCV 感染細胞と星細胞共培養すると HCV が星細胞に移行した。HCV が星細胞へ感染するメカニズムを解析している。さらに、HCV 慢性肝炎患者肝組織の星細胞における HCV タンパクの発現を確認した。

[在津拓馬, 青柳東代, 相崎英樹, 松浦知和(慈恵医大), 鈴木哲朗(浜松医科大学), 脇田隆字]

### (33) PLA2IB の HCV 粒子放出のメカニズムの解析

慢性 C 型肝炎患者に用いられているグリチルリチンの抗 HCV 作用について検討した。その結果、HCV 生活

環のうち、特に感染性粒子形成において強い阻害効果を示した。その阻害効果は PLA2 の抑制と autophagy 亢進によるものの可能性が示唆された。GL の Autophagy 誘導のメカニズム、PLA2IB の HCV 粒子放出のメカニズムについて調べている。

[青柳東代, 松本喜弘(慈恵医大消化器内科), 相崎英樹, 松浦知和(慈恵医大病院中央検査部), 和氣健二郎(ミノファージェン製薬), 脇田隆字]

### (34) 肝炎検査陽性者のフォローアップシステムの構築

肝炎ウイルス感染を知らずながら治療を続けていない人も 57-120 万人も存在すると推定されている。

そこで、肝炎ウイルス検査により見いだされた陽性者を専門医療機関へ導き、フォローアップすることを目的にしている。これまでに全国自治体肝炎対策者、拠点病院、検診組織と連絡を取り合い、各組織における適切な追跡システム導入を行っている。

[相崎英樹, 飯島尋子(兵庫医大), 石上 雅敏(名古屋大学), 片野義明(名古屋大学), 菊池嘉(国立国際医療研究センター), 工藤正俊(近畿大学), 坂本穰(山梨大学), 島上哲朗(金沢大学), 正木尚彦(国立国際医療研究センター), 吉岡健太郎(藤田保健), 米田政志(愛知医大), 渡邊綱正(名古屋市立大学), 脇田隆字]

### (35) 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、肝炎ウイルス感染、病態等を含む国内外の情報等の収集とデータベースの構築、および情報の提供を行って来た。感染研ウイルス第二部のホームページから、一般のヒト、家庭医、専門家向けに、それぞれ適切な内容の情報を発信している。感染症週報「HBV, HCV」を更新し、最新の治療について報告した。

[相崎英樹, 田中純子 (広島大), 脇田隆字]

(36) 本邦における急性C型肝炎のサーベイランス解析  
感染症法に基づくサーベイランス事業で、1999年から  
2013年間の14年間の急性C型肝炎の発生動向を調べ  
報告した。急性C型肝炎の発生は2010年ころから約  
50症例以下に抑制されていたものの、HIV陽性同性愛  
者の性的感染が増加傾向を示していた。

[相崎英樹, 砂川富正 (感染症疫学センター)、田中  
純子 (広島大), 脇田隆字]

(37) HIV陽性者における急性C型肝炎の集団発生につ  
いて

2012年、HIV陽性同性愛者から5人の急性HCV感染  
例が見出された。解析の結果、感染源を共有している  
可能性及び、濃厚かつ繰り返す感染機会を有していた  
可能性が考えられたため、全国の保健所を通じて、HIV  
陽性者に対しHCV感染予防について啓発を行ったとこ  
ろ、一時的であるが急性肝炎の発生を抑制できた。  
2014年に再び発生したことから、継続的な啓発の必要  
性が示された。

[青柳東代、井戸田一朗 (しらかば診療所)、相崎英樹、  
脇田隆字]

(38) 霊長類モデルを用いた培養細胞由来HCV粒子ワク  
チンの有効性の検討

霊長類モデルとしてマーマセットを用いて、培養細胞  
由来HCV粒子の免疫原性の検討を行った。アジュバント  
としてAlum群に加え、K3 CpGとSchizophyllan (SPG)  
の複合体であるK3-SPG群を設定し、HCV粒子ワクチンの  
有効性評価を行った。粒子免疫の結果、K3-SPGをアジ  
ュバントとして免疫したマーマセットでは、投与抗原  
と同じ遺伝子型2aだけでなく、遺伝子型1a、1bの構造  
タンパク質に対しても抗体価上昇が認められ、血漿よ  
り精製したIgG抗体は、遺伝子型2aのキメラHCVccだけ  
でなく、遺伝子型1b、1a、3aのキメラHCVccに対しても  
濃度依存的な感染阻害活性を示した。以上より、  
K3-SPGアジュバントを用いることにより培養上清由来

HCV粒子は高い感染防御効果を持つワクチンとなり得  
る可能性が示唆された。

[横川寛, 鈴木知比古 (東レ医薬研), 東濃篤徳 (京  
大霊長類研), 鈴木沙織 (京大霊長類研), 明里宏文  
(京大霊長類研), 石井孝司, 加藤孝宣, 脇田隆字]

(39) フェージディスプレイ法により見出したヒト抗E2  
抗体のHCVに対する感染中和活性の検討

HCV感染患者より得た抗体遺伝子ライブラリーを用い  
て、フェージディスプレイ法にてHCV E2エンベロープ  
タンパク質に親和性を示す抗体をスクリーニングした。  
スクリーニングにて見出した3種のIgG抗体に関して、  
HCVccに対する感染阻害活性を検討した。その結果、こ  
れら3種のIgG抗体は遺伝子型1a、1b、2a、3aのJFH-1  
キメラHCVccに対して強い感染阻害活性を示した。また、  
これら3種のヒト抗E2抗体は、エスケープミュータント  
が発生しづらい抗体であり、臨床開発が進む抗E2抗体  
MBL-HCV1のエスケープミュータントに対して強い感染  
阻害活性を示すことが明らかになった。

[横川寛, 鈴木知比古 (東レ医薬研), 篠原みどり (抗  
体研究所), 石井孝司, 加藤孝宣, 脇田隆字]

(40) 高純度HCV粒子精製方法の構築

近年、C型肝炎ウイルスは感染性粒子の細胞培養系が  
確立され、その不活化粒子は中和抗体を産生しうる抗  
原としてワクチン開発への利用が期待されている。本  
研究では、簡便にスケールアップが可能であるクロマ  
トグラフィー法を用いたHCV粒子の精製方法を選択し、  
その精製効率を検討した。Benzonase nucleaseを用  
いて精製前サンプルを処理し、夾雑核酸を分解するこ  
とによってイオン交換クロマトグラフィーにおける  
HCV粒子の回収量が増加し、精製効率が改善した。こ  
の精製産物をゲルろ過クロマトグラフィーにてさらに  
精製を行い、最終精製産物の回収率を求めたところ、  
超遠心精製とほぼ同等かそれ以上の精製効率である事  
が示唆された。今後、クロマトグラフィーのスケール  
アップ及びHPLCを用いた精製の自動化を行う予定で  
ある。

[横川寛, 鈴木知比古 (東レ医薬研), 石井孝司, 加藤孝宣, 脇田隆字]

#### (41) 全長遺伝子型 3a S310 株のウイルス粒子産生の検討

野生型全長遺伝子型 3a S310 株を用いて感染粒子が産生できるかを検討した。野生型 S310 株の合成 RNA を Huh7.5.1 細胞に導入して経代培養した。定期的に回収した上清中の HCV core 蛋白を測定した。2ヶ月間培養し続けたが、増殖が認められなかった。野生型 S310 株ではウイルス粒子の産生が見られなかった。

[Su Su Hmwe, Hideki Aizaki, Takaji Wakita]

#### (42) 感染性粒子産生系遺伝子型 2b の複製の検討

遺伝子型 2b の LSG+1 つの適応変異を導入した 8 つのクローンから分泌されたウイルスを新たな Huh7.5.1 細胞に感染させた。得られたウイルスを使用し再感染実験を行った結果、1 回目より 2 回目はウイルスの感染効率が良くなり、2 回目より 3 回目の方がよりウイルスの感染能が亢進した。その結果から、感染細胞の培養を継続するとウイルス粒子の分泌効率が向上することが明らかとなった。遺伝子型 2b の HCV ウイルスの Huh7.5.1 細胞への感染は CD81 と E2 抗体によって阻害されることが明らかになった。

[Su Su Hmwe, Goki Suda (Hokkaido University), Naoya Sakamoto (Hokkaido University), Michio Imamura (Hiroshima University), Nobuhiko Hiraga (Hiroshima University), Kazuhiko Chayama (Hiroshima University), Hideki Aizaki, Takaji Wakita]

#### (43) 感染性粒子産生系遺伝子型 2a と 2b に対する抗 HCV 感受性の検討

遺伝子型 2a と 2b に対する抗 HCV の感受性について検討した。その結果、PSI-6130, JTK-109, Cyclosporin A と IFN $\alpha$  で処理した細胞では遺伝子型 2a と 2b いずれの場合も HCV core と HCV RNA で同様な阻害効果が見られた。一方、BMS790052 で薬剤処理した細胞では遺

伝子型 2a の方が遺伝子型 2b よりも強い HCV 抑制効果を示した。

[Su Su Hmwe, Goki Suda (Hokkaido University), Naoya Sakamoto (Hokkaido University), Michio Imamura (Hiroshima University), Nobuhiko Hiraga (Hiroshima University), Kazuhiko Chayama (Hiroshima University), Hideki Aizaki, Takaji Wakita]

#### (44) N末端欠失E2により誘導されるE2抗体の解析

N末端欠失型 E2 タンパク質を免疫することで誘導される E2 抗体の性状について解析した。3 種類の E2 タンパク質、E2(384-714)、E2(411-714)、E2(421-714) を 293T 細胞で作製しアフィニティー精製した。E2 タンパク質をマウスに 2 週間隔 (合計 4 回) で免疫して誘導される E2 抗体量を ELISA 法で測定した。すべての抗原について血清中の E2 抗体量は増加した。HCV 感染阻害実験を行ったところ、E2(384-714)、E2(411-714) を免疫したマウス血清では阻害効果を示したが、E2(421-714) で効果が低下した。E2 タンパク質を免疫すると主にリニアエピトープ E2(411-423) 領域に対する中和抗体が誘導されるようである。[渡邊則幸、伊達朋子、相崎英樹、脇田隆字]

#### (45) HCV感染に重要な領域の探索

E1およびE2領域の20アミノ酸のペプチド (51種類) のうち、HCV感染阻害効果を示したE1 (282-301) とE1 (292-311) の二種類のペプチドの領域について、30アミノ酸のE1(282-311)を合成してHCV感染阻害効果を観察した。その結果、30アミノ酸のペプチドでも感染阻害効果を示した。阻害効果は濃度依存的で、異なる遺伝子型の構造領域を有するキメラHCVにおいても阻害効果は観察できた。また、ペプチドの前処理だけでも感染を阻害したことから、この領域は宿主細胞表面に結合するようである。

[渡邊則幸、伊達朋子、相崎英樹、脇田隆字]

#### 4. E型肝炎ウイルス (HEV) に関する研究



(1) HEV 感染性規定宿主因子の探索：委託作製 HEV 感染感受性 PLC/PRF/5 サブクローン cDNA ライブラリの評価

昨年度、非感受性細胞での functional cloning を目指して、感受性サブクローンからの cDNA ライブラリ作製をタカラバイオ株式会社ドラゴンジェノミクスセンターに依頼し、良好な複雑度及びインサート平均鎖長 1.5 kbp のライブラリを取得することができた。詳細な解析の結果、ORF 全長を多く含むことが判明し、本ライブラリは今後の感染性規定宿主因子の同定に大きく貢献するものと期待される。

[塩田智之, 李 天成, 吉崎佐矢香, 西村順裕, 清水博之, \*下島昌幸, \*西條 政幸, 脇田隆宇, 石井孝司 (\*ウイルス第一部) ]

(2) 昨年度作製した HEV 感染感受性 PLC/PRF/5 サブクローン cDNA ライブラリから得られた感染性規定宿主候補因子の解析

昨年度、候補因子の先行研究との比較による妥当性と、網羅的遺伝子発現比較解析における非感受性細胞での一様な発現低下が確認された。そこで、結合能を利用した functional cloning で断片が確認されていた感染性規定宿主候補因子の全長クローンを哺乳細胞発現ベクターへ搭載し、HEV 低結合性浮遊細胞に導入、薬剤選択によって安定発現株を樹立し、当該浮遊細胞の結合能獲得を確認した。また、Fc 融合候補因子タンパク質の作製を開始し、今後、免疫沈降法による候補因子とウイルス間の直接結合を確認する予定である。

[塩田智之, 李 天成, 吉崎佐矢香, 西村順裕, 清水博之, \*下島昌幸, \*西條 政幸, 脇田隆宇, 石井孝司 (\*ウイルス第一部) ]

(3) HEV 迅速感染評価系の構築

HEV 増殖の速い PLC/PRF/5 サブクローン 4-21 を用いて、培養上清中のウイルスがプラトーとなり次第、植え継ぐことを繰返して馴化させ、約 10 日での迅速感染評価系を構築した。

[塩田智之, 李 天成, 吉崎佐矢香, 西村順裕, 清水博

之, \*下島昌幸, \*西條 政幸, 脇田隆宇, 石井孝司 (\*ウイルス第一部) ]

(4) 非感受性細胞での HEV 受容体候補発現による gain of function の検証

非感受性細胞に HEV 受容体候補搭載ベクターを導入、薬剤選択によって安定発現株を樹立し、HEV 迅速感染評価系により抗原の分泌を確認した。

[塩田智之, 李 天成, 吉崎佐矢香, 西村順裕, 清水博之, \*下島昌幸, \*西條 政幸, 脇田隆宇, 石井孝司 (\*ウイルス第一部) ]

(5) ゲノム編集を用いた感受性細胞の HEV 受容体候補 knock out による loss of function の検証

CRISPR/Cas9 ゲノム編集による HEV 受容体候補欠損 4-21 細胞の作製をタカラバイオに委託し、現在、クローンのシーケンス中である。納品され次第、感染性への影響を評価したい。

[塩田智之, 李 天成, 吉崎佐矢香, 西村順裕, 清水博之, \*下島昌幸, \*西條 政幸, 脇田隆宇, 石井孝司 (\*ウイルス第一部) ]

(6) HEV レプリコンを用いたウイルス増殖阻害物質のスクリーニング

HEV レプリコン RNA を導入した細胞に薬剤ライブラリーを添加し、レプリコンのレポーター遺伝子の発現を指標として阻害剤のスクリーニングを行った。現在までに市販化合物ライブラリー、東大薬学部創薬イノベーションセンターおよび医薬基盤研究所薬用植物資源研究センターの化合物ライブラリーから、本レプリコンの増殖を抑制するスクリーニングを行い、ウイルス増殖阻害活性を持つ化合物を複数見出している。今後、作用機序の解析とウイルス阻害剤としての応用、ウイルス増殖メカニズム解析への応用を検討する予定。

[吉崎佐矢香, 脇田隆宇, 石井孝司]

(7)慢性E型肝炎患者由来HEVの解析とリバビリン耐性の検討

Burkittリンパ腫にて横須賀共済病院血液内科に入院中の患者に慢性肝炎の所見があり、ウイルス各種を調べたところHEV RNAが陽性であった。免疫不全を背景にしたE型肝炎慢性化の疑いにてリバビリン治療を行ったところ、ウイルス量の顕著な減少は見られたものの消失はせず、投与を継続してもウイルス量のむしろ増加が見られた。HEVの慢性化のメカニズムと、リバビリン耐性獲得の可能性について精査を行っている。

[三好正人、渡邊秀樹、池田隆明、李 天成、吉崎佐矢香、脇田隆宇、石井孝司]

#### (8) リバーシジェネティクス法を用いた Rat HEV 感染クローンの作製

本研究では、Rat HEV (ドイツ株) rat HEV の全長を解析した上、in vitro で全長 rat HEV RNA を合成した。Rat HEV RNA をヒト肝癌細胞 PLC/PRF/5 にトランスフェクションし、経時的に培養上清を採取し、ウイルス抗原と RNA を ELISA および RT-PCR により測定し、ウイルス増殖の有無を確認したうえ、全長 Rat HEV RNA の感染性を評価した。接種後二ヶ月から培養上清から rat HEV RNA が検出された。この培養上清をヌードラットに接種するとヌードラットの血清、糞便から rat HEV が検出された。その結果、Rat HEV 全長 RNA が感染性を有することが明らかになった。

[李 天成、吉崎 佐矢香、石井 孝司、\*網 康至、\*須崎百合子、脇田隆宇 (\*動物管理室)]

#### (9) Rat HEV ORF4 の機能の解析

Rat HEV の遺伝子構造は他の HEV と類似するが、Ferret HEV と同じ ORF4 というユニークなフレームを持っている。現在、ORF4 の機能はまだ明らかにされていない。本実験では Rat HEV (ドイツ株) rat HEV を用いて ORF4 のスタートコドン無くした全長 cDNA を作製したうえ、in vitro で RNA を合成した。ORF4 を持たない rat HEV RNA をヒト肝癌細胞 PLC/PRF/5 にトランスフェクションし、また、ヌードラット (Long Evans-rnu/rnu) 肝臓に

直接に接種して、ウイルス増殖の変化を観察した。現在、ORF4 を持たない rat HEV の増殖能が低下することがわかった。

[李 天成、吉崎 佐矢香、\*網 康至、\*須崎百合子、脇田隆宇 (\*動物管理室)]

#### (10) Nude rat と Rat HEV をモデルにした抗ウイルス製剤の評価

Rat HEV をヌードラット (Long-Evans rnu/rnu) に感染させると、rat HEV の持続感染を呈する。この持続感染モデルは、薬剤の抗ウイルス効果の観察に好適であると考えられる。本実験では rat HEV を感染させたヌードラットにリバビリンを経口投与し、抗ウイルス効果を観察した。その結果、リバビリンの経口投与による抗ウイルス作用が確認された。抗ウイルス作用は投与量に関連していた。また、リバビリンによる副作用も確認された。現在リバビリン投与によるウイルス変異の有無を確認している。

[李 天成、吉崎 佐矢香、\*網 康至、\*須崎百合子、脇田隆宇 (\*動物管理室)]

#### (11) Ferret HEV の細胞培養

Ferret HEV 陽性のフェレット便乳剤を濾過除菌してから、ヒト肝癌細胞 PLC/PRF/5 に接種し、経時的に培養上清を採取し、ウイルス抗原と RNA を ELISA あるいは RT-PCR により測定した。その結果、接種後一ヶ月から培養上清から Ferret HEV 抗原、Ferret HEV RNA が検出された。この培養上清をフェレットに接種するとフェレットの血清糞便から Ferret HEV が検出された。この結果、Ferret HEV は PLC/PRF/5 細胞で増殖することが示唆された。培養で獲得した ferret HEV をフェレットに経口接種したところ、ウイルスの増殖が確認された。Ferret HEV の培養細胞系を樹立した。

[李天成、Tingting Yang、吉崎 佐矢香、\*武田直和、脇田 隆宇、(\*大阪大学微生物病研究所)]

#### (12) ラクダ E 型肝炎ウイルス様粒子の作製およびその応用

ラクダ E 型肝炎ウイルス (DcHEV) は最近ヒトコブラクダから検出された新型 HEV であり、2 株の遺伝子配列以外、DcHEV に関する情報はほとんどない。DcHEV の感染状況把握、病原性と抗原性解析のため、本研究では DcHEV の構造蛋白を組換えバキュロウイルスで発現し、ウイルス様粒子の作成を試みた。N 末端 13aa あるいは 111aa を欠失した DcHEV ORF2 を RT-PCR 法で増幅した。定法どおり作製した組換えバキュロウイルスを昆虫細胞 Tn5 細胞に感染させ、構造蛋白を発現し、ウイルス様粒子 (DcHEV-LPs) の作製に成功した。DcHEV-LPs を用いて抗体検出 ELISA 法を樹立した。また、DcHEV 抗原性を従前既知の G1, G3, G4 HEV の抗原性と比較した。その結果、DcHEV の抗原性は、G1, G3, G4, G5 と G6 HEV との抗原性と類似することが判明した。

[李天成、周顯鳳、\*片岡紀代、\*\*武田直和、脇田隆宇 (\*感染病理部、\*\*大阪大学微生物病研究所、日本・タイ感染症共同研究センター)]

#### (13) スンクス由来 rat HEV 全長ゲノムのクローニング及び配列の解析

スンクスの糞便を出発材料として、スンクス由来 rat HEV 全長配列を解析した。Rat HEV RNA 陽性便を 10% 便乳剤に作成し、RNA を抽出した。RT-PCR 法を用いて Rat HEV 全長配列の増幅を試みた。現在一部領域の遺伝子の増幅に成功した。部分塩基及びアミノ酸の解析により、同じ地域で捕獲されたラット由来の rat HEV はと高いホモロジーを持っていることが明らかになっていた。現在全長配列を解析中である。

[李天成、\*Ke Changwen、\*\*網康至、\*\*須崎百合子、脇田隆宇 (\*中国広東 CDC、\*\*動物管理室)]

#### (14) フェレット E 型肝炎ウイルスの病原性の検討

Ferret HEV は最近発見された新しい E 型肝炎ウイルスである。ウイルス配列以外、このウイルスに関する情報がほとんど知られていない。本研究ではアメリカから輸入されたフェレットから経時的に採血と採便を行ない、血液中のウイルス抗原、抗体、ウイルス遺伝子、

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た。また、血中の ALT/AST、 $\gamma$ GTP を測定することにより、ウイルスの感染の特徴および病原性等を検討した。アメリカから輸入したフェレットでは、ferret HEV 感染後に ALT、AST が上昇し、ウイルス感染と肝機能障害の関連が示唆された。フェレットにおける ferret HEV の感染は不顕性感染、急性肝炎、持続感染という 3 つのパターンをとることが示された。

[李天成、楊ていてい、\*片岡紀代、\*\*網康至、\*\*須崎百合子、\*\*\*岸田典子、\*\*\*白倉雅之、\*\*\*今井正樹、\*\*\*浅沼秀樹、\*\*\*\*武田直和、脇田隆宇 (\*感染病理部、\*\*動物管理室、\*\*\*インフルエンザセンター、\*\*\*\*大阪大学微生物病研究所、日本・タイ感染症共同研究センター)]

#### (15) 茨城県内のイノシシにおける E 型肝炎の汚染状況検査

2013 年 12 月から 2014 年 3 月までに茨城県内の 3 地域において有害鳥獣駆除を目的として捕獲された合計 68 頭の野生イノシシから血液、肝臓、糞便を採取し、RT-PCR および ELISA により HEV ゲノムと抗 HEV 抗体の検出を行った。3 地域の合計はウイルス保有率が 10.29%(7/68)、抗体陽性率が 41.18%(28/68)となったが、地域間にかなり差が見られた。また、本調査で検出された HEV はすべての検体が日本型の Subgenotype3b(3jp)に分類されたが、系統樹上で大きく 2 系統に分類されたことから、各地域で由来の異なる HEV が野生動物に感染していることが推察された。[\*本谷 匠、\*永田紀子、\*小森はる、\*土井育子、\*黒澤美穂、\*氣田利正、李 天成、吉崎佐矢香、石井孝司 (\*茨城県衛生研究所)]

#### その他のウイルスに関する研究

##### (1) Polyomavirus NJPyV のウイルス様粒子の作製

Polyomavirus NJPyV はヒトの皮膚に紅斑性壊死を起こす新しいヒトポリオーマウイルスである。本研究はウイルス抗体の検出法を樹立するため、組換えバキュロウイルス発現システムを用いて NJPyV の VP1 を発

現し、ウイルス様粒子(VLP)を作製した。さらにNJPyV  
に対する抗体検出 ELISA 法を確立した。この抗体検出  
系は NJPyV の感染状況の解明に有用である。

[李 天成、周顕鳳、\*片岡紀代 (感染病理部)、脇田隆  
字 (\*感染病理部)]

## 発表業績一覧

## I. 誌上発表

## 1. 欧文発表

20 (4),709-712, 2014

1. Arita M, Kilpatrick DR, Nakamura T, Burns CC, Bukbuk D, Oderinde SB, Oberste MS, Kew OM, Pallansch MA, Shimizu H. Development of an efficient entire-capsid-coding-region amplification method for direct detection of poliovirus from stool extracts. *J Clin Microbiol* 53: 73-78, 2015
2. Arita M. Phosphatidylinositol-4 kinase III beta and oxysterol-binding protein accumulate unesterified cholesterol on poliovirus-induced membrane structure. *Microbiology and Immunology*, 58: 239-256, 2014
3. Choi JE, Hur W, Kim JH, Li TZ, Lee EB, Lee SW, Kang W, Shin EC, Wakita T, Yoon SK. MicroRNA-27a modulates HCV infection in differentiated hepatocyte-like cells from adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. *PLoS One*. 13;9(5):e91958. 2014
4. Daito T, Watashi K, Sluder A, Ohashi H, Nakajima S, Borroto-Esoda K, Fujita T, Wakita T. Cyclophilin inhibitors reduce phosphorylation of RNA-dependent protein kinase to restore expression of IFN-stimulated genes in HCV-infected cells. *Gastroenterology* 147(2): 463-472, 2014.
5. Dansako H, Hiramoto H, Ikeda M, Wakita T, Kato N. Rab18 is required for viral assembly of hepatitis C virus through trafficking of the core protein to lipid droplets. *Virology*. 462-463:166-74, 2014
6. Dennis FE, Fujii Y, Haga K, Damanka S, Lartey B, Agbemabiese CA, Ohta N, Armah GE, Katayama K: Identification of Novel Ghanaian G8P[6] Human-Bovine Reassortant Rotavirus Strain by Next Generation Sequencing. *PLoS One* 9(6):e100699. 2014
7. Esumi M, Ishibashi M, Yamaguchi H, Nakajima S, Tai Y, Kikuta S, Sugitani M, Takayama T, Tahara M, Takeda M, Wakita T. Transmembrane serine protease TMPRSS2 activates hepatitis C virus infection. *Hepatology*. 61(2):437-46, 2015
8. Fang L, Wang Z, Song S, Kataoka M, Ke C, Suzuki T, Wakita T, Takeda N, Li TC. Characterization of human bocavirus-like particles generated by recombinant baculoviruses. *J Virol Methods*. 207:38-44, 2014
9. Fujii Y, Nakagomi T, Nishimura N, Noguchi A, Miura S, Ito H, Doan YH, Takahashi T, Ozaki T, Katayama K, Nakagomi O: Spread and predominance in Japan of novel G1P[8] double-reassortant rotavirus strains possessing a DS-1-like genotype constellation typical of G2P[4] strains. *Infect Genet Evol*. 28:426-33, 2014
10. Fukuhara T, Wada M, Nakamura S, Ono C, Shiokawa M, Yamamoto S, Motomura T, Okamoto T, Okuzaki D, Yamamoto M, Saito I, Wakita T, Koike K, Matsuura Y. Amphipathic  $\alpha$ -helices in apolipoproteins are crucial to the formation of infectious hepatitis C virus particles. *PLoS Pathog*. 11;10(12):e1004534. 2014
11. Hiramoto H, Dansako H, Takeda M, Satoh S, Wakita T, Ikeda M, Kato N. Annexin A1 negatively regulates viral RNA replication of hepatitis C virus. *Acta Med Okayama*. 69(2):71-8. 2015
12. Ishibashi M, Morita N, Nomura-Kawaguchi C, Shimizu Y, Wakita T, Esumi M. CLEC4M-positive and CD81-negative Huh7 cells are not susceptible to JFH-1 HCVcc infection but mediate transinfection. *Arch Virol*.159(11):2949-55. 2014
13. Islam MJ, Hikosaka K, Noritake H, Uddin MK, Amin MB, Aoto K, Wu YX, Sato E, Kobayashi Y, Wakita T, Miura N. Pol I-transcribed hepatitis C virus genome RNA replicates, produces an infectious virus

- and leads to severe hepatic steatosis in transgenic mice. *Biomed Res.* 36(3):159-67. 2015
14. Iwamoto M, Watashi K, Tsukuda S, Aly HH, Fukasawa M, Fujimoto A, Suzuki R, Aizaki H, Ito T, Koiwai O, Kusuhara H, Wakita T. Evaluation and identification of hepatitis B virus entry inhibitors using HepG2 cells overexpressing a membrane transporter NTCP. *Biochem Biophys Res Commun* 443(3): 808-813, 2014.
  15. Jiang X, Kanda T, Wu S, Nakamoto S, Wakita T, Shirasawa H, Yokosuka O. Hepatitis C virus nonstructural protein 5A inhibits thapsigargin-induced apoptosis. *PLoS One.* ; 9(11): e113499. 2014
  16. Jiang X, Kanda T, Wu S, Nakamoto S, Saito K, Shirasawa H, Kiyohara T, Ishii K, Wakita T, Okamoto H, Yokosuka O. Suppression of La Antigen Exerts Potential Antiviral Effects against Hepatitis A Virus. *PLOS One*, 9, e101993, 2014
  17. Katayama K, Murakami K, Sharp TM, Guix S, Oka T, Takai-Todaka R, Nakanishi A, Crawford SE, Atmar RL, Estes MK. Plasmid-based human norovirus reverse genetics system produces reporter-tagged progeny virus containing infectious genomic RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 111(38):E4043-52, 2014
  18. Kim S, Date T, Yokokawa H, Kono T, Aizaki H, Maurel P, Gondeau C, Wakita T. Development of hepatitis C virus genotype 3a cell culture system. *Hepatology.* 60(6):1838-50. 2014
  19. Komoto S, Pongsuwanna Y, Ide T, Wakuda M, Guntapong R, Dennis FE, Haga K, Fujii Y, Katayama K, Taniguti K. Whole genomic analysis of porcine G10P[5] rotavirus strain P343 provides evidence for bovine-to-porcine interspecies transmission. *Veterinary Microbiology* 174, 577-583, 2014.
  20. Komoto S, Wandera Apondi E, Shah M, Odoyo E, Nyangao J, Tomita M, Wakuda M, Maeno Y, Shirat o H, Tsuji T, Ichinose Y, Taniguchi K. Whole genomic analysis of human G12P[6] and G12P[8] rotavirus strains that have emerged in Kenya: Identification of porcine-like NSP4 genes. *Infection, Genetics and Evolution*, 27, 277-293, 2014
  21. Kondo Y, Ninomiya M, Kimura O, Machida K, Funayama R, Nagashima T, Kobayashi K, Kakazu E, Kato T, Nakayama K, Lai MM, Shimosegawa T. HCV infection enhances Th17 commitment, which could affect the pathogenesis of autoimmune diseases. *PloS One* 9(6), e98521, 2014.
  22. Li TC, Yang T, Yoshizaki S, Ami Y, Suzaki Y, Ishii K, Haga K, Nakamura T, Ochiai S, Wakita T, John R. Construction and characterization of an infectious cDNA clone of rat hepatitis E virus. *Journal of General Virology* 96:1320-7, 2015
  23. Li TC, Yang T, Shiota T, Yoshizaki S, Yoshida H, Saito M, Imagawa T, Malbas F, Lupisan S, Oshitani H, Wakita T, Ishii K. Molecular detection of hepatitis E virus in rivers in the Philippines. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 90: 764-766, 2014
  24. Li TC, Fukumoto H, Hasegawa H, Wakita T, Saeki H, Suzuki T, Katano H. Seroprevalence of trichodysplasia spinulosa-associated polyomavirus in Japan. *J Clin Virol.* 65:76-82, 2015
  25. Li TC, Iwasaki K, Katano H, Kataoka M, Nagata N, Kobayashi K, Mizutani T, Takeda M, Wakita T, Suzuki T. Characterization of Self-assembled Virus-like Particles of Merkel Cell Polyomavirus. *PLOS ONE*, 10(2):e0115646,2015
  26. Li TC, Yang T, Ami Y, Suzaki Y, Shirakura M, Kishida N, Asanuma H, Takeda N, and Wakita T. Full Genome of Ferret Hepatitis E Virus from Laboratory Ferrets. *Emerg Infect Dis.* 20(4):709-12, 2014
  27. Li TC, Yonemitsu K, Terada Y, Takeda N, Wakita T and Maeda K. Ferret hepatitis E virus infection in

- Japan. JJID 68(1):60-62, 2015
28. Li Y, Masaki T, Shimakami T, Lemon SM. hnRNP L and NF90 interact with hepatitis C virus 5'-terminal untranslated RNA and promote efficient replication. *J Virol* 88(13): 7199-7209, 2014.
  29. Lin CM, Gao X, Oka T, Vlasova AN, Esseili MA, Wang Q, Saif LJ. Antigenic relationships among porcine epidemic diarrhea virus and transmissible gastroenteritis virus strains. *J Virol*. 89 (6): 3332-42, 2015
  30. Liu X, Saito M, Sayama Y, Suzuki E, Malbas FF, Galang HO, Furuse Y, Saito M, Li TC, Suzuki A, Oshitani H. Seroprevalence and molecular characteristics of hepatitis E virus in household-raised pig population in Philippines. *BMC Vet Res*. 11(1):11, 2015
  31. Masaki T, Arend KC, Li Y, Yamane D, McGivern DR, Kato T, Wakita T, Moorman NJ, Lemon SM. miR-122 stimulates hepatitis C virus RNA synthesis by altering the balance of viral RNAs engaged in replication versus translation. *Cell Host Microbe* 17(2): 217-228, 2015.
  32. Masaki T, Matsunaga S, Takahashi H, Nakashima K, Kimura Y, Ito M, Matsuda M, Murayama A, Kato T, Hirano H, Endo Y, Lemon SM, Wakita T, Sawasaki T, Suzuki T. Involvement of hepatitis C virus NS5A hyperphosphorylation mediated by casein kinase I- $\alpha$  in infectious virus production. *J Virol* 88(13): 7541-7555, 2014.
  33. Masuda T, Nagai M, Yamasato H, Tsuchiaka S, Okazaki S, Katayama Y, Oba M, Nishiura N, Sassa Y, Omatsu T, Furuya T, Koyama S, Shirai J, Taniguchi K, Fujii Y, Todaka R, Katayama K, Mizutani T: Identification of novel bovine group A rotavirus G15P[14] strain from epizootic diarrhea of adult cows by de novo sequencing using a next-generation sequencer. *Vet Microbiol* 171(1-2):66-73, 2014
  34. Matsuda M, Suzuki R, Kataoka C, Watashi K, Aizaki H, Kato N, Matsuura Y, Suzuki T, Wakita T. Alternative endocytosis pathway for productive entry of hepatitis C virus. *J Gen Virol* 95(Pt12):2658-2667, 2014.
  35. McGivern DR, Masaki T, Williford S, Ingravallo P, Feng Z, Lahser F, Asante-Appiah E, Neddermann P, De Francesco R, Howe AY, Lemon SM. Kinetic analyses reveal potent and early blockade of hepatitis C virus assembly by NS5A inhibitors. *Gastroenterology* 147(2): 453-462, 2014.
  36. Munakata T, Inada M, Tokunaga Y, Wakita T, Kohara M, Nomoto A. Suppression of hepatitis C virus replication by cyclin-dependent kinase inhibitors. *Antiviral Res*. 108:79-87, 2014
  37. Naeem A, Hosomi T, Nishimura Y, Alam MM, Oka T, Zaidi SS, Shimizu H. Genetic diversity of circulating Saffold viruses in Pakistan and Afghanistan. *J Gen Virol* 95: 1945-1957, 2014
  38. Nakai M, Seya T, Matsumoto M, Shimotohno K, Sakamoto N, Aly HH. The J6JFH1 strain of hepatitis C virus infects human B-cells with low replication efficacy. *Viral Immunol* 27(6): 285-94, 2014.
  39. Ogura N, Watashi K, Noguchi T, Wakita T. Formation of covalently closed circular DNA in Hep38.7-Tet cells, a tetracycline inducible hepatitis B virus expression cell line. *Biochem Biophys Res Commun* 452(3): 315-321, 2014.
  40. Oka T, Saif LJ, Marthaler D, Esseili MA, Meulia T, Lin CM, Vlasova AN, Jung K, Zhang Y, Wang Q. Cell culture isolation and sequence analysis of genetically diverse US porcine epidemic diarrhea virus strains including a novel strain with a large deletion in the spike gene. *Vet Microbiol*. 173 (3-4): 258-69, 2014

41. Oka T, Saif LJ, Yang Z, Scheuer KA, Stoltzfus GT, Wang Q. First Complete Genome Sequences of Genogroup VI Porcine Sapoviruses Genome Announc. 2 (2).2014
42. Oka T, Takagi H, Tohya Y. Development of a novel single step reverse genetics system for feline calicivirus. J Virol Methods. 207:178-81, 2014
43. Oka T, Wang Q, Katayama K, Saif LJ. Comprehensive review of human sapoviruses. Clin Microbiol Rev. 28 (1): 32-53, 2015
44. Okitsu S, Khamrin P, Thongprachum A, Kalesaran AF, Takanashi S, Shimizu H, Maneekarn N, Mizuguchi M, Hayakawa S, Ushijima H. Molecular characterization and sequence analysis of the 2B region of Aichivirus C strains in Japan and Thailand. Infect Genet Evol 26: 89-94, 2014
45. Okitsu S, Khamrin P, Thongprachum A, Nishimura S, Kalesaran AF, Takanashi S, Shimizu H, Hayakawa S, Mizuguchi M, Ushijima H. Detection and molecular characterization of human cosavirus in a pediatric patient with acute gastroenteritis, Japan. Infect Genet Evol 28: 125-129, 2014
46. Saito K, Shirasago Y, Suzuki T, Aizaki H, Hanada K, Wakita T, Nishijima M, Fukasawa M. Targeting cellular squalene synthase, an enzyme essential for cholesterol biosynthesis, is a potential antiviral strategy against hepatitis C virus. J Virol. 89(4):2220-32, 2015
47. Sato A, Kameyama K, Nagai M, Tateishi K, Ohmori K, Todaka R, Katayama K, Mizutani T, Yamakawa M, Shirai J. Complete Genome Sequence of Bovine Viral Diarrhea Virus 2 Japanese Reference and Vaccine Strain KZ-91CP. Genome Announc. 3(1). pii: e01573-14, 2015
48. Sato S, Li K, Kameyama T, Hayashi T, Ishida Y, Murakami S, Watanabe T, Iijima S, Sakurai Y, Watashi K, Tsutsumi S, Sato Y, Akita H, Wakita T, Rice CM, Harashima H, Kohara M, Tanaka Y, Takaoka A. The RNA sensor RIG-I dually functions as an innate sensor and direct antiviral factor for hepatitis B virus. Immunity 42(1):123-32, 2015
49. Selitsky SR, Baran-Gale J, Honda M, Yamane D, Masaki T, Fannin EE, Guerra B, Shirasaki T, Shimakami T, Kaneko S, Lanford RE, Lemon SM, Sethupathy P. Small tRNA-derived RNAs are increased and more abundant than microRNAs in chronic hepatitis B and C. Sci Rep 5: 7675, 2015.
50. Shibata S, Sekizuka T, Kodaira A, Kuroda M, Haga K, Doan YH, Takai-Todaka R, Katayama K, Wakita T, Oka T, Hirata H. Complete Genome Sequence of a Novel GV.2 Sapovirus Strain, NGY-1, Detected from a Suspected Foodborne Gastroenteritis Outbreak. Genome Announc. 3(1). pii: e01553-14, 2015
51. Shimizu H, Nakashima K. Surveillance of hand, foot, and mouth disease for a vaccine. Lancet Infect. Dis. 14(4), 262-3, 2014
52. Shiokawa M, Fukuhara T, Ono C, Yamamoto S, Okamoto T, Watanabe N, Wakita T, Matsuura Y. Novel permissive cell lines for complete propagation of hepatitis C virus. J Virol. 88(10):5578-94, 2014
53. Shiota T, Li TC, Yoshizaki S, Kato T, Wakita T, Ishii K. Establishment of hepatitis E virus infection-permissive and -non-permissive human hepatoma PLC/PRF/5 subclones. Microbiol Immunol 59(2):89-94, 2015
54. Shirasago Y, Sekizuka T, Saito K, Suzuki T, Wakita T, Hanada K, Kuroda M, Abe R, Fukasawa M. Isolation and characterization of an Huh.7.5.1-derived cell clone highly permissive to hepatitis C virus. Jpn J Infect Dis. 68(2):81-8, 2015
55. Shirato H, Someya Y, Ochiai M, Horiuchi Y, Takahashi M, Takeda N, Wakabayashi K, Ouchi Y, Ota Y, Tano Y, Abe S, Yamazaki S, Wakita T, sIPV Evaluation Group of NIID Virology II. A national



- reference for inactivated polio vaccine derived from Sabin strains in Japan. *Vaccine* 32: 5163-5169, 2014
56. Sugiyama K, Ebinuma H, Nakamoto N, Sakasegawa N, Murakami Y, Chu PS, Usui S, Ishibashi Y, Wakayama Y, Taniki N, Murata H, Saito Y, Fukasawa M, Saito K, Yamagishi Y, Wakita T, Takaku H, Hibi T, Saito H, Kanai T. Prominent steatosis with hypermetabolism of the cell line permissive for years of infection with hepatitis C virus. *PLoS One*. 9(4):e94460, 2014
  57. Sugiyama N, Murayama A, Suzuki R, Watanabe N, Shiina M, Liang TJ, Wakita T, Kato T. Single strain isolation method for cell culture-adapted hepatitis C virus by end-point dilution and infection. *PLoS One* 9(5): e98168, 2014.
  58. Sung PS, Murayama A, Kang W, Kim MS, Yoon SK, Fukasawa M, Kondoh M, Kim JS, Kim H, Kato T, Shin EC. Hepatitis C virus entry is impaired by claudin-1 downregulation in diacylglycerol acyltransferase-1-deficient cells. *J Virol*. 88(16): 9233-9244, 2014.
  59. Tang J, Yoshida H, Ding Z, Tao Z, Zhang J, Tian B, Zhang L. Molecular Epidemiology and Recombination of Human Enteroviruses from AFP surveillance in Yunnan, China from 2006 to 2010. *Scientific reports*, 4: 6058, 2014
  60. Tanida I, Shirasago Y, Suzuki R, Abe R, Wakita T, Hanada K, Fukasawa M. Caffeic acid, a coffee-related organic acid, inhibits the propagation of hepatitis C virus. *Jpn J Infect Dis*. 68:268-275, 2015.
  61. Tsukuda S, Watashi K, Iwamoto M, Suzuki R, Aizaki H, Okada M, Sugiyama M, Kojima S, Tanaka Y, Mizokami M, Li J, Tong S, Wakita T. Dysregulation of retinoic acid receptor diminishes hepatocyte permissiveness to hepatitis B virus infection through modulation of sodium taurocholate cotransporting polypeptide (NTCP) expression. *J Biol Chem*. 290(9):5673-84, 2015
  62. Wang H, Tao Z, Li Y, Lin X, Yoshida H, Song L, Zhang Y, Wang S, Cui N, Xu W, Song Y, Xu A. Environmental Surveillance of Human Enteroviruses in Shandong Province, China, 2008-2012: Serotypes, Temporal Fluctuation and Molecular Epidemiology. *Appl Environ Microbiol*. 80(15): 4683-4691, 2014
  63. Watashi K, Sluder A, Daito T, Matsunaga S, Ryo A, Nagamori S, Iwamoto M, Nakajima S, Tsukuda S, Borroto-Esoda K, Sugiyama M, Tanaka Y, Kanai Y, Kusuhara H, Mizokami M, Wakita T. Cyclosporin A and its analogs inhibit hepatitis B virus entry into cultured hepatocytes through targeting a membrane transporter, sodium taurocholate cotransporting polypeptide (NTCP). *Hepatology* 59(5): 1726-1737, 2014.
  64. Watashi K, Urban S, Li W, Wakita T. NTCP and beyond: opening the door to unveil hepatitis B virus entry. *Int J Mol Sci* 15(2): 2892-2905, 2014.
  65. Wright PF, Wieland-Alter W, Ilyushina NA, Hoen AG, Arita M, Boesch AW, Ackerman ME, van der Avoort, MH, Oberste S, Pallansch MA, Burton AH, Jaffar MA, and Sutter RW. Intestinal immunity is a determinant of clearance of poliovirus after oral vaccination. *Journal of Infectious Diseases*, 209: 1628-1634, 2014
  66. Xeuatvongsa A, Komada K, Kitamura T, Vongphrachanh P, Pathammavong C, Phounphenghak K, Sisouk T, Phonekeo D, Sengkeopaseuth B, Som-Oulay V, Ishii K, Wakita T, Sugiyama M, Hachiya M. Chronic Hepatitis B Prevalence among Children and Mothers: Results from a Nationwide, Population-Based Survey in Lao People's Democratic Republic. *PLoS One*, 9, e88829, 2014

- 1) 相崎英樹、松田麻未、藤本陽、脇田隆宇、HCV 感染実験系における代謝変化、臨床消化器内科、29(7):810-813, 2014
- 2) 相崎英樹、脇田隆宇、肝炎ウイルス検査のすすめ: 暮らしの豆知識、国民生活センター編、200-201, 2015
- 3) 有田峰太郎、感染症の治療に向けて - ポリオ根絶計画におけるアカデミア創薬の試み、2014 実験医学、増刊号「研究成果を薬につなげるアカデミア創薬の戦略と実例」、第 32 巻、第 2 号、P205-209, 2014
- 4) 石井孝司 環境中 A 型肝炎ウイルス遺伝子の検出と分子疫学的応用 臨床とウイルス 42: 242-246, 2014
- 5) 石井孝司 A 型肝炎、E 型肝炎 臨床と微生物 41: 72-78, 2014
- 6) 石井孝司、清原知子、脇田隆宇 A 型肝炎ウイルス感染症 東京小児科医学会報 33: 11-17, 2014
- 7) 伊藤雅, 岩切章, 内野清子, 小澤広規, 北川和寛, 葛口剛, 下野尚悦, 神保達也, 高橋雅輝, 板持雅恵, 筒井理華, 濱崎光宏, 山崎謙治, 中田恵子, 吉田弘, 平成 25 年度感染症流行予測調査事業ポリオ環境水調査期間中 (2013 年 4~12 月) に検出されたエンテロウイルスについて IASR Vol. 35 p. 275-276: 2014 年 11 月号
- 8) 岡智一郎: 食品衛生検査指針 微生物編 2015 公益社団法人 日本食品衛生協会 サポウイルス p684-692. 2015. 3.
- 9) 片山和彦 備えて立ち向かう感染性胃腸炎 ノロウイルス・ロタウイルス ノロウイルス感染症とは-ウイルスの特徴・流行変遷・臨床病態 感染症対策 ICT ジャーナル vol. 9 No. 4 2014.
- 10) 片山和彦 特集 ノロウイルス感染症 ノロウイルスの感染拡大を防ぐには 調剤と情報 vol. 20 No. 12, 14-19, 2014
- 11) 片山和彦 特集 ノロウイルス感染症 ノロウイルスとは 調剤と情報 vol. 20 No. 12, 10-12, 2014
- 12) 片山和彦 少年写真新聞社 中学保健ニュース ノロウイルスの感染予防 Dec. 18, 2014.
- 13) 片山和彦 少年写真新聞社 高校保健ニュース ノロウイルスの感染予防 Dec. 18, 2014.
- 14) 片山和彦 質疑応答臨床一般 夏場にノロウイルスによる胃腸炎や食中毒が発生する可能性 日本医事新報 No. 4723, 59-60, 2014.
- 15) 片山和彦 医薬品の品質管理とウイルス安全性 第 7 章 新しいウイルス検出法、ウイルス診断法、ウイルス試験 総論 日本医薬品等ウイルス安全性研究会
- 16) 片山和彦 ヒトに感染するノロウイルスの感染様式の研究 黎明 vol23, pi-ii, 2014.
- 17) 片山和彦 ノロウイルス感染症とその対策 救命救急 vol. 17 No. 1 12-15, 2014.
- 18) 片山和彦 Luncheon Seminar Report No. 1 ノロウイルス - 感染制御を目指した研究の歩みと最新の成果- デンカ生研、p1-4、リーフレット、2015/02/24
- 19) 北川和寛 千葉一樹 鈴木理恵 五十嵐郁美 柏木佳子 金成篤子, 吉田学, 笹原賢司, 門馬直太, 吉田弘 無菌性髄膜炎患者から検出されたエコーウイルス 9 型、2002~2013 年—福島県, IASR Vol. 35 p. 249-250: 2014 年 10 月号
- 20) 島津幸枝、久常有里、池田周平、東久保靖、谷澤由枝、重本直樹、高尾信一、米倉圭二、白石泰尚、谷博雄、原三千丸、吉田弘 エンテロウイルス D-68 型が検出された小児・乳児の 4 症例—広島県 IASR Vol. 35 p. 295- 296: 2014 年 12 月号
- 21) 清水博之、「消化器ウイルス篇 エンテロウイルス-ポリオウイルスおよび非ポリオエンテロウイルス」の項を担当、臨床医のための呼吸器・消化管ウイルス感染症、103-109, 診断と治療社、東京、2014
- 22) 清水博之: 東アジア地域を中心とした手足口病流行の現状. 感染症 43, 50-51, 54-59 2014
- 23) 清水博之: 急増した手足口病 感染・炎症・免疫 44, 94-96, 2014

- 24) 清水博之, ライノウイルスの分類と疾患への関与, 日本医事新報 4689: 53-55, 2014
- 25) 白土東子 (分担執筆): *Norovirus and Histo-blood Group Antigens. Glycoscience: Biology and Medicine*, 731-735, 2014
- 26) 高山直秀, 崎山 弘, 清水博之, 梅本 哲. 経口生ポリオワクチン1~2回目および不活化ポリオワクチン1~4回目接種の全国累積接種率: 2013年の調査結果. 日本医師会雑誌 143: 609-614, 2014
- 27) 筒井理華 古川紗耶香 木村政明 工藤真哉 笹けい子, 吉田弘. 無菌性髄膜炎患者からのエコーウイルス30型の検出—青森県, *IASR Vol. 35 p. 242-243*: 2014年10月号
- 28) 吉田弘. 水環境中のウイルス情報の収集と活用 ポリオウイルス-不活化ワクチン開発後の野生株侵入状況把握 臨床とウイルス 42 (5) 224-230. 2014年12月号
- 29) 脇田隆宇, 肝炎ウイルスに関する研究の進展 *Annual Review 消化器* 2015 巻 Page51-56, 2015
- 30) 脇田隆宇, HCV 培養系はどこまで進んだか臨床 消化器内科 29 巻 7 号 Page803-809, 2014
- 31) 国立感染症研究所感染症疫学センター・ウイルス第二部. エンテロウイルス68型に関する主な知見と国内の疫学状況のまとめ(2014年11月4日現在). 病原微生物検出情報, 2014
3. その他
- 1) 相崎英樹, 飯島尋子, 石上雅敏, 上野義之, 小川浩司, 片野義明, 菊池嘉, 工藤正俊, 酒井明人, 坂本穰, 島上哲朗, 下田和哉, 日浅陽一, 正木尚彦, 持田智, 吉岡健太郎, 吉澤要, 米田政志, 渡邊綱正, 是永匡紹: 肝炎ウイルス陽性者フォローアップ導入マニュアル第二版、効率的な肝炎ウイルス検査陽性者フォローアップシステムの構築のための研究班、2014.
- 2) 相崎英樹, 飯島尋子, 石上雅敏, 上野義之, 小川浩司, 片野義明, 菊池嘉, 工藤正俊, 酒井明人, 坂本穰, 島上哲朗, 下田和哉, 日浅陽一, 正木尚彦, 持田智, 吉岡健太郎, 吉澤要, 米田政志, 渡邊綱正, 是永匡紹: 自治体向け肝炎ウイルス陽性者フォローアップ導入マニュアル第三版、効率的な肝炎ウイルス検査陽性者フォローアップシステムの構築のための研究班、2015.
4. (新聞) 指導、監修
- 1) 片山和彦 少年写真新聞 中学保健ニュース ノロウイルスの感染経路を知ろう 2014年12月18日
- 2) 片山和彦 少年写真新聞 高校保健ニュース ノロウイルスの感染経路を知ろう 2014年12月18日
- II. 学会発表
- 国際学会
- 1) Akahori Y, Kato H, Fujita T, Watashi K, Wakita T, Hijikata M. Development of hepatitis B virus cell culture system using immortalized human hepatocytes producing exogenous Na<sup>+</sup>/taurocholate cotransporting polypeptide. 2014 International Meeting on the Molecular Biology of Hepatitis B Viruses, Los Angeles (USA), Sep, 2014
- 2) Aly HH, Watashi K, Chayama K, Wakita T. Analyzing new host mechanism suppressing hepatitis B virus replication. TAsL-Japan Hepatitis B Workshop. Taipei, Taiwan. 2014. 4. 19-20.
- 3) Aly HH, Watashi K, Chayama K, Wakita T. Host factors interacting with Hepatitis B virus life cycle. Egyptian-Japanese day, molecular biology of hepatitis viruses. Cairo, Egypt. 2014. 9. 30. – 10. 4.
- 4) Ariumi Y, M Kuroki, R Siddiqui, M Hijikata, M Ikeda, T Wakita, N Kato. DDX21 RNA helicase restricts HCV infection. 21st International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Banff (Canada), Sep, 2014
- 5) Fujii Y, Doan YH, Nakagomi T, Nakagomi O, Katayama K: Continued circulation of novel G1P[8] double-reassortant strains carrying the DS-1-like

- genotype constellation in Japan. 17th International Conference on Emerging Infectious Diseases (EID) (Taipei) Jan. 25-29, 2015.
- 6) Fujii Y : Molecular evolutionary study of rotavirus genome using next generation sequencer. NIID International Seminar on Infectious Diseases (Tokyo) Jan. 22-23, 2015.
- 7) Fujimoto A, Aizaki H, Matsuda M, Watanabe N, Watashi K, Suzuki R, Suzuki T, Wakita T. Maintenance of HCV infectivity by down-regulating hepatic lipase expression. 21st International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Banff (Canada), Sep, 2014
- 8) Fukasawa M, Shimizu Y, Shirasago Y, Iwamoto M, Watashi K, Tanaka Y, Wakita T, Kondoh M, Yagi K, Hanada K. Efficient HBV infection system in cell cultured cells. 2014 International Meeting on the Molecular Biology of Hepatitis B Viruses, Los Angeles (USA), Sep, 2014
- 9) Goto K, Fujimoto A, Watashi K, Suzuki R, Yamagoe S, Moriya K, Yotsuyanagi H, Koike K, Suzuki T, Miyamura T, Wakita T, Aizaki H. NS5A-associated membrane protein, embryonic lethal, abnormal vision, drosophila-like 1, regulates hepatitis C virus RNA synthesis and translation. 21st International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Banff (Canada), Sep, 2014
- 10) Ishii K. Epidemiological and genetic analysis of a large outbreak of hepatitis A in Japan, 2014. The 10th China-Japan International Conference of Virology. Changchun, China, Aug, 25-27, 2014
- 11) Ishii K. Epidemiological and genetic analysis of an outbreak of hepatitis A in Japan, 2014. The 11th Japan-Taiwan Symposium on New Technologies Applied to Public Health Including Foodborne Diseases and Drug Resistance. Taipei, Taiwan, Sep, 11-12, 2014
- 12) Ishii K, Kiyohara T, Yoshizaki S, Shimada T, Nakamura N, Nakashima K, Tada Y, Noda M, Wakita T. Molecular epidemiological analysis of recent hepatitis A in Japan and Asian countries. 10th Asia Pacific Travel Health Conference, Ho Chi Minh City, Viet Nam, May 7-11, 2014
- 13) Ishii K, Kiyohara T, Yoshizaki S, Tada T, Shimada T, Nakashima K, Noda M, Wakita T. Epidemiological and genetic analysis of hepatitis A in Japan. Blankenberge, Belgium, March 9-14, 2014
- 14) Ito M, Fukuhara T, Suzuki R, Matsuura Y, Wakita T, Suzuki T. Use of Huh7-derived, bidirectional oval-like cells to identify differentiation-dependent host factors that are involved in regulation of HCV lifecycle. 21st International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Banff (Canada), Sep, 2014
- 15) Iwamoto M, Watashi K, Sugiyama M, Suzuki R, Aizaki H, Tanaka Y, Mizokami M, Ohtani N, Koiwai O, Wakita T. Microtubule-dependent hepatitis B virus (HBV) replication revealed by chemical screening on an efficient HBV-replicating cell line. 2014 International Meeting on the Molecular Biology of Hepatitis B Viruses, Los Angeles (USA), Sep, 2014
- 16) Johne R, Yang T, Yoshizaki S, Ami Y, Suzaki Y, Ishii K, Haga K, Nakamura T, Ochiai S., Wakita T, Li TC. Establishment of a reverse genetics system for rat hepatitis E virus. 25th Annual Meeting of the Society for Virology, Bochum (Germany), 18–21 March 2015
- 17) Katayama K, Park YB, Takai-Todaka R, Haga K. Investigation of Human Norovirus evolution in human body. Japan-Taiwan joint meeting. Taipei (Taiwan), Jan 29, 2015.
- 18) Kato T, Sugiyama N, Murayama A, Matsumura T, Shiina M, Asabe S, Wakita T, Imawari M. Antimicrobial Peptide LL-37 Deteriorate Infectivity of Hepatitis C Virus. 21st International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Banff

- (Canada), Sep. 7-11. 2014
- 19) Li T.C., Ochiai K., Yang T., Yoshizaki S., Takeda N., Ishii K., Wakita T. Characterization of a case of hepatitis E that imported from Spain. 10th Asia Pacific Travel Health Conference, Ho Chi Minh City (Viet Nam), May 7-11, 2014
  - 20) Li T.C., Yang T., Kataoka M., Ami Y., Suzaki Y., Kishida N., Shirakura M., Imai M., Asanuma H., Takeda N., Wakita T. Characterization of Self-Assembled Virus-Like Particles of Ferret Hepatitis E Virus Generated by Recombinant Baculoviruses. International Union of Microbiological Societies (IUMS 2014), Canada, July 27-August 1, 2014
  - 21) Li T.C., Yang T., Yoshizaki S., Ami Y., Suzaki Y., Ishii K., Haga K., Nakamura T., Ochiai S., Wakita T., Johne R. Characterization of Self-Assembled Virus-Like Particles of Ferret Hepatitis E Virus Generated by Recombinant Baculoviruses. The 10th China-Japan International Conference of Virology. Changchun (China), August 24-27, 2014
  - 22) Li Y., Masaki T., Shimakami T., Lemon SM. HnRNP L, PCBP2 and NF90 are HCV host factors that interact with viral 5' terminal untranslated RNA and compete with miR-122 binding. 21st International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Banff (Canada), Sep. 7-11. 2014
  - 23) Lovell W., Masaki T., Feng Z., Hamlett C., Saalau-Bethell S., Graham B., McGivern D. Using direct-acting antivirals to probe the multiple functions of the NS3/4A protease-helicase in the hepatitis C virus life cycle. 21st International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Banff (Canada), Sep. 7-11. 2014
  - 24) Masaki T., Arend KC., Li Y., Yamane D., McGivern DR., Moorman NJ., Lemon SM. miR-122 promotes expansion of the HCV replicase complex by redirecting translating viral RNAs to replicat ion and directly stimulating RNA synthesis. 21st International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Banff (Canada), Sep. 7-11. 2014
  - 25) Masaki T., Matsunaga S., Takahashi H., Nakashima K., Kimura Y., Ito M., Matsuda M., Murayama A., Kato T., Hirano H., Endo Y., Lemon SM., Wakita T., Sawasaki T., Suzuki T. Involvement of hepatitis C virus NS5A hyperphosphorylation mediated by casein kinase I- $\alpha$  in infectious virus production. 21st International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Banff (Canada), Sep. 7-11. 2014
  - 26) Matsuda M., Nakanishi A., Li TC., Suzuki R., Katano H., Wakita T., Suzuki T. Selective recognition of gangliosides by human polyomaviruses: Role of GD3 and GM3 in merkel cell polyomavirus infection. 7th International conference on HPV, Polyomavirus & UV in skin cancer, Novara (Italy), Apr, 2014
  - 27) Matsunaga S., Miyakawa K., Watashi K., Wakita T., Ryo A. Wheat germ cell-free system-based production of hepatitis B virus X (HBx) protein for generation and characterization of monoclonal antibody. 2014 International Meeting on the Molecular Biology of Hepatitis B Viruses, Los Angeles (USA), Sep, 2014
  - 28) McGivern DR., Masaki T., Williford S., Lemon SM. NS5A inhibitors block virus assembly and disrupt the interaction of NS5A with NS2. 21st International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Banff (Canada), Sep. 7-11. 2014
  - 29) Miki M., Park YB., Haga K., Doan HY., Suzuki Y. and Katayama K. Investigation of human norovirus shedding and genome evolution in a single infection cycle in infant. 17th International Conference on Emerging Infectious Diseases. Taipei (Taiwan), Jan 29, 2015.
  - 30) Murayama A., Sugiyama N., Wakita T., Kato T.

- Hepatitis C Virus Replication in a Monkey Kidney-derived Cell Line. 21st International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Banff (Canada), Sep. 7-11. 2014
- 31) Murayama A, Sugiyama N, Wakita T, Kato T. Infection and Replication of Hepatitis C Virus in Vero Cells Derived from Green Monkey Kidney. 65th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases, Boston (USA), Nov. 7-11. 2014
- 32) Nakajima S, Watashi K, Kamisuki S, Takemoto K, Izaguirre-Carbonell J, Suzuki R, Aizaki H, Sugawara F, Wakita T. Regulation of hepatitis C virus replication by liver X receptor is disrupted by a fungi-derived neoechinulin B. 21st International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Banff (Canada), Sep, 2014
- 33) Nojima K, T Shimoike, T Wakita, I Hamaguchi, Y Okada. Evaluation of Hepatitis C Virus JFH-1 Infectivity and RNA Distribution During Plasma Fractionation. American Association of Blood Banks Annual Meeting Boston (USA), Oct. 25-28, 2014
- 34) Ohashi H, Watashi K, Nakajima S, Kim S, Suzuki R, Aizaki H, Kamisuki S, Sugawara F, Wakita T. Flutamide inhibits hepatitis C virus assembly through disrupting lipid droplets. 21st International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Banff (Canada), Sep, 2014
- 35) Oka T, Ogo N, Oba M, Ando T, Zhu C, Asai A, Katayama K, Wang Q, Saif LJ. Identification of Sapovirus Infection and Growth Inhibitory Molecules. American Society for Virology 33<sup>rd</sup> Annual Meeting. Colorado (USA), June21-25, 2014
- 36) Oka T, Saif LJ, Yang Z, Scheuer KA, Stoltzfus GT, Wang Q. First Complete Genome Sequences of Sapovirus Genogroup VI Strains Detected from Diarrheic Pigs. American Society for Virology 33<sup>rd</sup> Annual Meeting. Colorado (USA), June21-25, 2014
- 37) Saga R, Fujimoto A, Watanabe N, Matsuda M, Hasegawa M, Watashi K, Aizaki H, Nakamura N, Konishi E, Kato T, Takeyama H, Wakita T, Suzuki R. Japanese Encephalitis Virus-subviral particles harboring HCV neutralization epitopes induce neutralizing antibodies against HCV. 21st International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Banff (Canada), Sep, 2014
- 38) Shi G, Ando T, Suzuki R, Ito M, Nakashima K, Wakita T, Suzuki T. HCV 3'UTR as a cis-acting element required for the viral RNA encapsidation. 21st International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Banff (Canada), Sep, 2014
- 39) Shimizu H. Molecular basis of virus-host interaction and pathogenesis of enterovirus 71 infection. Monto Ho Memorial Lectures on Enterovirus 71, 2014 International Symposium on Infectious Disease and Signal Transduction, Tainan (Taiwan), 2 November, 2014
- 40) Shimizu H. Overview of hand, foot, and mouth disease and enterovirus infections. JICA Training Workshop on Biosafety and HFMD Laboratory Diagnosis, Hanoi (Viet Nam), 14-18 July 2014
- 41) Shimizu H. Structural and functional basis of the interaction between enterovirus 71 and a cellular receptor, PSGL-1. Protein Island Matsuyama International Symposium, Matsuyama, Ehime, 17 September, 2014
- 42) Shimizu H. The host cellular receptors for enterovirus 71. The 2nd Symposium on Research and Quality Control of Vaccines, Tokyo, 3 March, 2015
- 43) Shimizu H. The molecular basis of the interaction between EV71 and PSGL-1 from structural and functional standpoints. TLL Seminar, Temasek Life Science Laboratory, Singapore, 25 September, 2014
- 44) Shimizu H. Virology of Enterovirus 71. JICA Training Workshop on Biosafety and HFMD Laboratory

- Diagnosis, Hanoi (Viet Nam), 14-18 July 2014
- 45) Shimizu H. WHO Collaborating Centre for Virus Reference and Research (Enteroviruses). (Poster). The First Regional Forum Of Who Collaborating Centres in the Western Pacific, Manila (Philippines), 13-14 November, 2014
- 46) Shiota T. Searching for the host factors involved in hepatitis E virus infection. MGH-U Tokyo Symposium: *Frontiers in Biomedical Engineering* (Celebrating the 10th year of MGH-U Tokyo Summer Student Internship Program), Boston (U.S.A), Sep. 24. 2014
- 47) Shirasago Y, T Sekizuka, K Saito, T Suzuki, T Wakita, K Hanada, M Kuroda, R Abe, M Fukasawa. Isolation and Characterization of A Huh.7.5.1-Derived Cell Clone Highly Permissive to Hepatitis C Virus. 21st International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Banff (Canada), Sep, 2014
- 48) Sugiyama R, Sugiyama N, Murayama A, Tasaka-Fujita M, Masaki T, Wakita T, Kato T. Elucidation of effects on HCV propagation and ISG induction by amino acid substitution in interferon sensitivity-determining region. 21st International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Banff (Canada), 7-11, Sep, 2014
- 49) Suzuki R, Saito K, Matsuda M, Sato M, Kanegae Y, Watashi K, Aizaki H, Chiba J, Saito I, Wakita T, Suzuki T. Single domain intrabodies against HCV core inhibit viral propagation and core-induced NF-κB activation. 21st International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Banff (Canada), Sep, 2014
- 50) Tsukuda S, Watashi K, Iwamoto M, Suzuki R, Aizaki H, Kojima S, Sugiyama M, Tanaka Y, Mizokami M, Wakita T. Retinoid inhibitors abolish the host permissiveness to HBV infection by modulating NTCP expression. 2014 International Meeting on the Molecular Biology of Hepatitis B Viruses, Los Angeles (USA), Sep, 2014
- 51) Wakita T. Cell culture models of hepatitis C virus. 21st International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Banff (Canada), Sep, 2014
- 52) Wakita T. HBV entry inhibitors. EID meeting, Taipei (Taiwan), January 26-29, 2015
- 53) Wakita T, N Ogura, H Aly, K Watashi. Novel target molecules for HBV drug development. The 11<sup>th</sup> JSH Single Topic Conference, Hiroshima, Nov 20-21, 2014
- 54) Watashi K, Iwamoto M, Sluder A, Matsunaga S, Ryo A, Morishita R, Kwon ATJ, Suzuki H, Tsukuda S, Suzuki R, Aizaki H, Borroto-Esoda K, Sugiyama M, Tanaka Y, Mizokami M, Wakita T. Characterization of a culture system reproducing the NTCP-mediated HBV entry and its application to drug development. 2014 International Meeting on the Molecular Biology of Hepatitis B Viruses, Los Angeles (USA), Sep, 2014
- 55) Yamaguchi H, K Kuroda, T Wakita, M Esumi. A role of Golgi membrane protein 1 (GOLM1) in HCV replication. 21st International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Banff (Canada), Sep, 2014
- 56) Yokokawa H, Nakamura N, Higashino A, Suzuki S, Akari H, Ishii K, Kato T, Wakita T. Inactivated hepatitis C virus particle vaccine induces anti-HCV antibodies in common marmosets. 21st International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Banff (Canada), 7-11, Sep, 2014.
- 57) Yoshida K, Zhou Y, Takai-Todaka R, Katayama K, Nakanishi A. Functional complementation of VP2 in murine norovirus. 17th International Conference on Emerging Infectious Diseases. Taipei (Taiwan), Jan 29, 2015.
2. 国内学会
- 1) 青柳東代, 相崎英樹, 松本喜弘, 鈴木亮介, 渡士

- 幸一, 市野瀬志津子, 松浦知和, 鈴木哲朗, 和氣健二郎, 脇田隆宇, グリチルリチンによる抗 C 型肝炎ウイルス作用 Phospholipase A2 および Autophagy による HCV 分泌過程の制御, 第 50 回日本肝臓学会総会, 東京, 2014. 5. 29-30.
- 2) 青柳東代, 相崎英樹, 藤本陽, 松本喜弘, 松田麻未, Su Su Hmwe, 渡邊則幸, 渡土幸一, 鈴木亮介, 市野瀬志津子, 松浦知和, 鈴木哲朗, 和氣健二郎, 脇田隆宇, グリチルリチンによる抗 HCV 作用 - phospholipase A2 および Autophagy による C 型肝炎ウイルス (HCV) 分泌過程に与える影響 -. 第 24 回抗ウイルス療法研究会総会, 富士急, 2014 年 5 月
- 3) 赤堀祐一, 加藤博己, 藤田尚志, 渡土幸一, 脇田隆宇, 土方誠, ヒト NTCP 恒常発現不死化ヒト肝細胞を用いた B 型肝炎ウイルス培養細胞感染系の構築, 第 62 回日本ウイルス学会学術集会, 横浜, 2014 年 11 月
- 4) 吾郷昌信, 北川由美香, 松本文昭, 吉川亮, 陣内久美子, 森内浩幸, 永田典代, 清水博之, 森田交一. 新生児重症感染を惹起したコクサッキーウイルス B2 型の性状解析. 第 62 回日本ウイルス学会学術集会, 横浜市, 11 月 10~12 日, 2014
- 5) Hussein Aly, 渡土幸一, 茶山一彰, 脇田隆宇, The identification of a new interferon-independent host mechanism suppressing hepatitis B virus replication. 第 62 回日本ウイルス学会学術集会, 横浜, 2014 年 11 月
- 6) アリ・ハッサン・フセイン, 渡土幸一, 茶山一彰, 脇田隆宇. The identification of a new host mechanism suppressing Hepatitis B virus replication. 第 62 回日本ウイルス学会学術集会, 横浜, 2014. 11. 10-12.
- 7) アリ・ハッサン・フセイン. SKIV2L helicase suppress HBV replication in interferon independent manner. 第 11 回 Single Topic Conference. 広島, 2014. 11. 20-21.
- 8) アリ・ハッサン・フセイン. The identification of a new interferon independent anti-hepatitis B virus pathway. The second Japan-Italy hepatitis meeting. 広島, 2014. 11. 18-19.
- 9) 有田峰太郎: PI4KB/OSBP 経路はポリオウイルス感染で誘導される膜構造にコレステロールを蓄積する. 第 62 回 日本ウイルス学会総会, 横浜, 2014. 11. 10
- 10) 有田峰太郎: フェノタイプスクリーニング 古くて新しい創薬手法. CBI 学会研究講演会, 東京, 2014. 9. 12.
- 11) 石井孝司, 清原知子, 吉崎佐矢香, 八幡裕一郎, 河端邦夫, 金山敦宏, 山岸拓也, 高橋琢理, 有馬雄三, 木下一美, 齊藤剛仁, 松井珠乃, 大石和徳, 砂川富正, 脇田隆宇: 2014 年春季に日本で多発した A 型肝炎の分子疫学的解析, 第 62 回日本ウイルス学会, 平成 26 年 11 月, 横浜
- 12) 石井孝司: 日本における A 型肝炎の現状について, 第 11 回日本小児消化管感染症研究会, 平成 27 年 2 月, 大阪
- 13) 石井孝司: 日本における A 型肝炎の現状について, 第 29 回関東甲信静支部ウイルス研究部会, 平成 26 年 9 月, 長野
- 14) 石田豊和, 久保田智巳, 白土東子: ノロウイルスキャプシドタンパク質とウイルス抗原との糖鎖認識機構. 第 8 回分子科学討論会, 2014 年 9 月
- 15) 井手富彦, 河本聡志, 森口匡子, Dennis Francis Ekow, 芳賀慧, 藤井克樹, 片山和彦, Shofiqur Rahman, 梅田浩二, Sa Van Nguyen, 辻孝雄, 谷口孝喜: ミャンマーにおける G12P[8] ヒトロウイルスの全塩基配列に基づく遺伝子解析 第 62 回日本ウイルス学会学術集会 (横浜) 2014 年 11 月 10-12 日
- 16) 伊藤昌彦, 福原崇介, 鈴木亮介, 田川陽一, 松浦善治, 脇田隆宇, 鈴木哲朗. HuH-7 由来オーバル細胞様細胞株 Hdo による HCV 生活環の調節に関わる分化関連宿主因子の同定. 日本ウイルス学会第 62 回学術集会, 横浜, 2014 年 11 月



- 17) 岩本将土、渡士幸一、九十田千子、Hussein Aly、藤本陽、鈴木亮介、相崎英樹、脇田隆宇、深澤征義、小祝修、楠原洋之、ヒト NTCP 安定発現による B 型肝炎ウイルス (HBV) 感染許容性の獲得とそれを介した HBV 侵入機構の解析、第 22 回肝病態生理研究会、東京、2014 年 5 月
- 18) 岩本将土、渡士幸一、杉山真也、鈴木亮介、相崎英樹、田中靖人、溝上雅史、大谷直子、小祝修、脇田隆宇、効率的な B 型肝炎ウイルス (HBV) 複製評価系を用いた微小管依存的な HBV 複製機構の解析、第 62 回日本ウイルス学会学術集会、横浜
- 19) 大橋啓史、渡士幸一、中嶋翔、金ソレイ、鈴木亮介、相崎英樹、紙透伸治、菅原二三男、脇田隆宇、Aryl hydrocarbon receptor による脂肪滴形成及び C 型肝炎ウイルス粒子構築の制御、第 62 回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014 年 11 月
- 20) 大橋啓史、渡士幸一、中嶋翔、金ソレイ、鈴木亮介、相崎英樹、紙透伸治、菅原二三男、脇田隆宇、C 型肝炎ウイルス粒子の構築を阻害する flutamide の作用機序の解析。第 24 回抗ウイルス療法研究会総会、富士急、2014 年 5 月
- 21) 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 26 回学術集会、東京大学工学部 14 号館 141 号教室、2014. 11. 9.
- 22) 岡 智一郎、横山勝、高木弘隆、小島宏建、長野哲雄、岡部隆義、遠矢幸伸、片山和彦、佐藤裕徳、カリシウイルスプロテアーゼの基質を模倣した非ペプチド性化合物の抗ウイルス活性の評価。第 62 回日本ウイルス学会学術集会、パシフィコ横浜、2014、11. 10-12
- 23) 沖津祥子、Aksara Thongprachum、西村修一、高梨さやか、清水博之、早川智、牛島廣治：日本の小児急性胃腸炎患者から検出されたヒトコサウイルスの解析。第 55 回日本臨床ウイルス学会。札幌市、6 月 14 日～6 月 15 日、2014
- 24) 片岡周子、西村順裕、鈴木忠樹、小谷治、岩田奈織子、永田典代、網康至、清水博之、エンテロウイルス 71 のカニクイザルにおける病原性の解析。第 62 回日本ウイルス学会学術集会、横浜市、11 月 10～12 日、2014
- 25) 清原知子、石井孝司、杉山真也、溝上雅史、脇田隆宇：10-15 歳児における HBs 抗原保有率調査、第 18 回日本ワクチン学会、2014 年 12 月、福岡
- 26) 國戸偉丸、櫻井文教、高山和雄、脇田隆宇、立花雅史、水口裕之、ヒト iPS 細胞由来分化誘導肝細胞における C 型肝炎ウイルス作用後の宿主応答の解析、日本薬学会第 135 年会、神戸学院大学、(2014、3. 25-28)
- 27) 久保田智巳、石田豊和、白土東子：結晶構造を基にしたノロウイルスキャプシドタンパク質とウイルス抗原との結合エネルギー解析。第 37 回日本分子生物学会年会、2014 年 11 月
- 28) 河本聡志、井手富彦、和久田光毅、Dennis Francis Ekow、芳賀慧、藤井克樹、片山和彦、谷口孝喜：タイで検出された G10P[5] ブタロタウイルス P343 株ゲノムの全塩基配列の解析 第 62 回日本ウイルス学会学術集会 (横浜) 2014 年 11 月 10-12 日
- 29) 小谷治、藤井健、鈴木忠樹、岩田奈織子、網康至、須崎百合子、長谷川秀樹、田口文広、清水博之、永田典代、カニクイザルを用いた Saffold virus の神経病原性の病理学的解析。第 62 回日本ウイルス学会学術集会、横浜市、11 月 10～12 日、2014
- 30) Lingbao Kong、青柳春代、松田麻未、藤本陽、渡士幸一、鈴木亮介、山越智、堂前直、鈴木健裕、鈴木哲朗、脇田隆宇、相崎英樹、Prolactin regulatory element binding protein is involved in hepatitis C virus replication by interacting with NS4B。第 62 回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014 年 11 月
- 31) 佐藤弘、多屋馨子、大石和徳、清水博之、不活化ワクチン導入前後のポリオの予防接種状況および抗体保有状況 (2013 年度感染症流行予測調査より)。第 18 回日本ワクチン学会学術集会。福岡市、12 月 6～7 日、2014
- 32) 塩田智之、李 天成、吉崎佐矢香、西村順裕、清水博之、下島昌幸、西條政幸、脇田隆宇、石井孝司：E 型肝炎ウイルス感染性規定因子宿主候補に関する研究、第 62 回日本ウイルス学会、2014 年 11 月、横浜

- 33) 清水博之. ウイルス学会における利益相反管理と開示について. 利益相反シンポジウム. 第 62 回日本ウイルス学会学術集会. 横浜市, 11 月 10~12 日, 2014
- 34) 清水博之: 世界ポリオ根絶計画とポリオワクチンのこれから. 第 46 回日本小児感染症学会学術集会. 新宿, 東京, 10 月 19 日, 2014
- 35) 清水博之. 重症腸管ウイルス感染症の原因ウイルスと実験室診断. 国立国際医療センターセミナー, 東京, 11 月 18 日, 2014
- 36) 下池貴志, 朴英斌, 戸高玲子, 朴三用, 脇田隆宇, 片山和彦: ノロウイルス RNA 依存的 RNA ポリメラーゼの *in vitro* 転写活性 第 62 回日本ウイルス学会学術集会, 2014 年 11 月, 横浜
- 37) 下池貴志, 野島清子, 脇田隆宇, 岡田義昭, 河端邦夫, 清原知子, 石井孝司, 脇田隆宇, 金山敦宏, 八幡裕一郎, 松井珠乃, 砂川富正, 大石和徳: A 型肝炎の家族内感染についての疫学的解析 (2014 年上半期を中心に), 第 18 回日本ワクチン学会, 2014 年 12 月, 福岡
- 38) 白砂圭崇, 谷田以誠, 清水芳実, 鈴木哲朗, 脇田隆宇, 花田賢太郎, 近藤昌夫, 安部良, 深澤征義, Occludin のノックアウト肝細胞の樹立と本細胞を用いた HCV 感染の解析, 日本薬学会第 135 年会, 神戸, (2014, 3. 25-28)
- 39) 杉山隆一, 杉山奈央, 村山麻子, 藤田めぐみ, 山田典栄, 脇田隆宇, 加藤孝宣. NS5A-ISDR アミノ酸変異が HCV 増殖に与える影響の解析. 第 24 回抗ウイルス療法研究会総会. 山梨, 2014. 7. 8-9.
- 40) 嵯峨涼平, 藤本陽, 渡邊則幸, 松田麻未, 長谷川慎, 渡士幸一, 相崎英樹, 中村紀子, 小西英二, 加藤孝宣, 田島茂, 高崎智彦, 竹山春子, 脇田隆宇, 鈴木亮介, 日本脳炎ウイルスおよび C 型肝炎ウイルス 2 価ワクチン抗原の発現と中和抗体の誘導, 第 62 回日本ウイルス学会学術集会, 横浜, 2014 年 11 月
- 41) 武田緑, 池田正徳, 佐藤伸哉, 團迫浩方, 脇田隆宇, 加藤宣之, 小胞輸送蛋白質 Rab13 は HCV 感染に必要な宿主因子である, 第 18 回日本肝臓学会大会, 神戸, 2014 年 10 月 23-26 日
- 42) 九十田千子, 渡士幸一, 岩本将士, 鈴木亮介, 相崎英樹, 小嶋聡一, 杉山真也, 田中靖人, 溝上雅史, 脇田隆宇, レチノイド阻害剤は NTCP 発現修飾を介して宿主細胞の B 型肝炎ウイルス感染感受性を消失させる, 第 62 回日本ウイルス学会学術集会, 横浜, 2014 年 11 月
- 43) 九十田千子, 渡士幸一, 岩本将士, 鈴木亮介, 相崎英樹, 小嶋聡一, 脇田隆宇, HBV 感染受容体 NTCP の発現調節機構の解析およびこれを阻害する低分子化合物の抗 HBV 効果, 第 24 回抗ウイルス療法研究会総会, 富士急, 2014 年 5 月
- 44) 戸高玲子, 村上耕介, 岡智一郎, 朴英斌, 中西章, 脇田隆宇, 片山和彦: レポーター遺伝子を内包したノロウイルス感染性粒子の作製の試み 第 62 回日本ウイルス学会学術集会, 2014 年 11 月, 横浜
- 45) 土橋香織, 葛西宏威, 田中智久, 陳文家, 渡士幸一, 脇田隆宇, 山下篤哉, 梁明秀, 岡本徹, 松浦善治, 森石恆司, トリプシン・EDTA による NTCP 依存 HBV 感染の増強, 第 62 回日本ウイルス学会学術集会, 横浜, 2014 年 11 月
- 46) 外山政明, 濱崎隆之, 岡本実佳, 渡士幸一, 脇田隆宇, 馬場昌範, 新規 7-deazaneplanocin A 及び 7-deaza-8-azaneplanocin A 誘導体の抗 HBV 効果, 第 62 回日本ウイルス学会学術集会, 横浜, 2014 年 11 月
- 47) 外山政明, 濱崎隆之, 岡本実佳, 渡士幸一, 脇田隆宇, 馬場昌範. HBV カプシドタンパク質を標的とした新規抗 HBV 薬の探索. 第 24 回抗ウイルス療法研究会総会, 富士急, 2014 年 5 月
- 48) 中嶋翔, 渡士幸一, 紙透伸治, 竹本健二, Jesus Izaguirre-Carbonell, 鈴木亮介, 相崎英樹, 菅原二三男, 脇田隆宇, 天然有機化合物 Neoechinulin B を利用した liver X receptor による C 型肝炎ウイルス産生制御機構の解析, 第 62 回日本ウイルス学会学術集会, 横浜, 2014 年 11 月
- 49) 中村朋史, 有田峰太郎, 清水博之: ウイルス受容

- 体特異性を応用した環境水からのポリオウイルス直接検出法の開発. 第 62 回 日本ウイルス学会総会、横浜、2014. 11. 10.
- 50) 深澤征義、清水芳実、白砂圭崇、岩本将士、渡士幸一、田中靖人、脇田隆宇、近藤昌夫、八木清仁、花田賢太郎、効率的な HBV 感染培養細胞系の構築に関する研究、第 62 回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014 年 11 月
- 51) 福島慎二、中野貴司、清水博之、濱田篤郎. 日本人成人に対する不活化ポリオワクチン追加接種の免疫原性. 第 18 回日本ワクチン学会学術集会. 福岡市、12 月 6~7 日、2014
- 52) 福島慎二、清原知子、石井孝司、中野貴司、濱田篤郎：不活化 A 型肝炎ワクチンの互換性研究～エイムゲンと HAVRIX～、第 18 回日本ワクチン学会、2014 年 12 月、福岡
- 53) 藤井克樹：Impact of next generation sequencing technologies on whole genome analysis of rotaviruses (シンポジウム) 第 62 回日本ウイルス学会学術集会 (横浜) 2014 年 11 月 10-12 日
- 54) 藤井克樹：ロタウイルスの検出法と疫学調査 平成 26 年度希少感染症診断技術研修会 (東京) 2015 年 2 月 17-18 日
- 55) 藤井克樹：ロタウイルスの分子疫学とロタウイルスワクチン (シンポジウム) 第 63 回日本感染症学会東日本地方会総会学術集会・第 61 回日本化学療法学会東日本支部総会合同学会 (東京) 2014 年 10 月 29-31 日
- 56) 藤本嗣人、花岡希、藤巻明日香、萩美貴、清水博之：兵庫県で脳炎を引き起こしたエンテロウイルス 71(EV71)の分子疫学. 第 55 回日本臨床ウイルス学会. 札幌市、6 月 14 日~6 月 15 日、2014
- 57) 町田早苗、清水博之. ヒトパレコウイルス (HPeV)3 型の増殖機構の解析. 第 62 回日本ウイルス学会学術集会. 横浜市、11 月 10~12 日、2014
- 58) 松田麻未、鈴木亮介、嵯峨涼平、藤本陽、渡士幸一、相崎英樹、森石恆司、岡本徹、松浦善治、黒田俊一、脇田隆宇、遺伝子組換え酵母由来 B 型肝炎ウイルス様粒子の細胞表面への結合に関与する宿主因子の解析、第 62 回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014 年 11 月
- 59) 宮川敬、松永智子、渡士幸一、杉山真也、溝上雅史、脇田隆宇、梁明秀、宿主防御因子 Tetherin-BST2 による B 型肝炎ウイルス感染抑制とその回避機構の解明、第 62 回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014 年 11 月
- 60) 村山麻子、藤原圭、脇田隆宇、加藤孝宣、C 型肝炎ウイルスの細胞培養系を用いた第二世代 NS5A 阻害剤の抗ウイルス活性の評価、第 50 回日本肝臓学会総会、東京、2014 年 5 月 29-30 日
- 61) 村山麻子、杉山奈央、脇田隆宇、加藤孝宣. C 型肝炎ウイルスが感染複製可能なペロ細胞株の樹立. 第 37 回日本分子生物学会年会、横浜、2014. 11. 25-27.
- 62) 村山麻子、藤原圭、脇田隆宇、加藤孝宣. C 型肝炎ウイルスの細胞培養系を用いた第二世代 NS5A 阻害剤の抗ウイルス活性の評価. 第 50 回日本肝臓学会総会、東京、2014. 5. 29-30.
- 63) 安本順、葛西宏威、土橋香織、山下篤哉、渡士幸一、脇田隆宇、田中智久、森石恆司、HBV 感染による細胞内脂肪滴形成への影響、第 62 回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014 年 11 月
- 64) 山下篤哉、藤本雄介、田中智久、葛西宏威、児玉栄一、渡士幸一、脇田隆宇、前川伸哉、榎本信幸、田中淳一、森石恆司、海洋生物抽出物ライブラリーソースからの B 型肝炎ウイルス転写活性抑制化合物の探索、第 62 回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014 年 11 月
- 65) 山田典栄、小林稔、安田清美、奥瀬千晃、四柳宏、鈴木通博. HBs 抗原消失を目標とした核酸アナログ間欠投与の可能性に関する検討. 第 50 回日本肝臓学会総会、東京、2014. 5. 29-30.
- 66) 山田典栄、小林稔、奥瀬千晃、鈴木通博、四柳宏、加藤孝宣、安田清美. 首都圏における B 型肝炎ウイルス genotype の変遷. 第 40 回日本肝臓学会東部会、

東京, 2014. 11. 27-28.

- 67) 山本達郎, 櫻井文教, 高山和雄, 立花雅史, 渡士幸一, 脇田隆宇, 飯島沙幸, 田中靖人, 水口裕之、ヒト iPS 細胞由来分化誘導肝細胞の B 型肝炎ウイルス感染評価系への応用、日本薬学会第 135 年会、神戸学院大学、(2014, 3.25-28)
- 68) 山本達郎, 櫻井文教, 高山和雄, 立花雅史, 渡士幸一, 脇田隆宇, 飯島沙幸, 田中靖人, 水口裕之、ヒト iPS 細胞由来分化誘導肝細胞を用いた B 型肝炎ウイルス感染評価系の開発、第 62 回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014 年 11 月
- 69) 横川寛, 中村紀子, 東濃篤徳, 鈴木沙織, 明里宏文, 加藤孝宣, 石井孝司, 脇田隆宇. 培養細胞由来 C 型肝炎ウイルス粒子のマーモセットにおけるワクチン効果の検討. 第 37 回日本分子生物学会年会, 横浜, 2014. 11. 25-27.
- 70) 横川寛, 中村紀子, 東濃篤徳, 鈴木沙織, 明里宏文, 加藤孝宣, 石井孝司, 脇田隆宇. 培養細胞由来 HCV 粒子のマーモセットにおける抗 HCV 抗体誘導能の検討. 第 62 回日本ウイルス学会学術集会, 横浜, 2014. 11. 10-12.
- 71) 吉田弘 「エンテロウイルス感染症の動向と環境水サーベイランスについて」神奈川県衛生研究所平成 25 年度第 2 回公衆衛生専門技術研修 2014. 2. 25
- 72) 吉田弘 「ポリオ環境水サーベイランスについて」平成 26 年度中国四国地域レファレンスセンター連絡会議 2014 年 11 月 21 日
- 73) 吉田弘 「感染症サーベイランスにおける病原体検査の精度管理導入に向けた検討状況」埼玉県衛生研究所 2015 年 2 月 20 日
- 74) 吉田弘 「環境水ウイルスサーベイランスでわかること」平成 25 年度第 2 回健康福祉局衛生研究所衛生技術研修会 2014 年 3 月 14 日
- 75) 史国利, 安東友美, 鈴木亮介, 松田麻未, 伊藤昌彦, 中島謙治, 脇田隆宇, 鈴木哲朗. 肝細胞を用いた B 型肝炎ウイルス感染評価系の開発、第 014, 3.25-2 日本ウイルス学会第 62 回学術集会, 横浜,

2014 年 11 月

- 76) 李天成, 米満 研三, 寺田 豊, 片岡 紀代, 網 康至, 須崎 百合子, 岸田 典子, 白倉 雅之, 浅沼 秀樹, 前田 健, 武田 直和, 脇田隆宇, Ferret HEV 抗体検出系の樹立および疫学調査、第 157 回日本獣医学会学術集会、札幌、(2014, 9.9-12)
- 77) 李天成、網康至、須崎百合子、浅沼秀樹、岸田典子、白倉雅之、武田直和、脇田隆宇。フェレット E 型肝炎ウイルスの病原性と E 型肝炎動物モデル。第 62 回日本ウイルス学会学術集会、2014 年 11 月横浜。
- 78) 脇田隆宇, 相崎 英樹, 渡士 幸一、C 型肝炎ウイルス生活環全体を標的とした新規作用を有する抗ウイルス剤の探索、第 50 回日本肝臓学会総会、東京、2014. 5. 29-30.
- 79) 脇田隆宇、B型肝炎ワクチン定期接種化と肝炎ウイルスの基礎研究に関する話題、肝炎治療講演会、ウィリング横浜 (2015, 3.28) 講演
- 80) 脇田隆宇、C型肝炎ウイルスの複製増殖機構の解析、第 16 回仙台Liver Meeting、ウェスティンホテル仙台、(2014, 7.5) 特別講演
- 81) 脇田隆宇、肝炎ウイルスの基礎研究、第 5 回肝臓よろず勉強会、静岡第一ホテル、(2014, 11.2) 講演
- 82) 脇田隆宇、肝炎研究Up date、第 16 回PEGクラブ in広島、リーガロイヤルホテル広島、(2014, 10.31) 特別講演
- 83) 脇田隆宇、相崎英樹、渡士幸一、C型肝炎ウイルス生活環全体を標的とした新規作用を有する抗ウイルス剤の探索、第50回日本肝臓学会総会、東京、2014年5月
- 84) 渡士 幸一, 相崎 英樹, 脇田 隆宇、肝炎ウイルスに対する創薬研究 培養系を用いた抗B型肝炎ウイルス化合物の同定と作用機序解析、第 50 回日本肝臓学会総会、東京、2014. 5. 29-30.
- 85) 渡士幸一、Ann Sluder、松永智子、梁明秀、森下了、岩本将士、九十田千子、鈴木亮介、相崎英樹、Katyna Borroto-Esoda、田中靖人、楠原洋之、杉山

真也、溝上雅史、脇田隆宇、B型肝炎ウイルス(HBV) large S タンパク質と NTCP の相互作用阻害による抗 HBV 戦略、第 62 回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014 年 11 月

- 86) 渡士幸一、Ann Sluder、松永智子、梁明秀、森下了、岩本将士、九十田千子、鈴木亮介、相崎英樹、Katyna Borroto-Esoda、田中靖人、楠原洋之、杉山真也、溝上雅史、脇田隆宇、B型肝炎ウイルス(HBV)L タンパク質と NTCP の相互作用阻害による抗 HBV 戦略、第 24 回抗ウイルス療法研究会総会、富士急、2014 年 5 月
- 87) 渡士幸一、相崎英樹、脇田隆宇、培養系を用いた抗 B型肝炎ウイルス化合物の同定と作用機序解析、第 50 回日本肝臓学会総会、東京、2014 年 5 月

### III. その他

- 1) 片山和彦 第 11 回日本小児消化管感染症研究会教育講演 ノロウイルスの最近の知見 大阪大学中之島センター・大阪市、2015 年 2 月 7 日
- 2) 片山和彦 第 15 回北多摩北部感染対策研究会 ノロウイルス感染症 国立療養所東京病院講義室、2014 年 11 月 25 日
- 3) 片山和彦 小児感染症学会 ランチョンセミナー ノロウイルスの最近の知見 東京都京王プラザホテル、2014 年 10 月 19 日
- 4) 片山和彦 小金井市医師会講演会 “知っているようで知らないノロウイルス” 東京都小金井市医師会ホール、2014 年 9 月 8 日
- 5) 片山和彦 第 39 回食品衛生懇話会 “食品安全行政の現状と最近の諸問題について・ノロウイルスの最近の知見について 日本食品衛生協会 渋谷区神宮前、2014 年 8 月 1 日
- 6) 片山和彦 特定非営利活動法人食の安全を確保するための微生物検査協議会 “知っているようで知らないノロウイルス” 日本橋、2014 年 11 月 27 日
- 7) 片山和彦 “知っているようで知らないノロウイルス” 健康公開講座 NHK 横浜放送局共催横浜市民講座・神奈川県横浜市、2014 年 11 月 15 日
- 8) 片山和彦 ウイルス学会サテライトセミナー 横浜市民講座 “ノロウイルス” 日本ウイルス学会・神奈川県横浜市、2014 年 11 月 9 日
- 9) 片山和彦 ノロウイルス 郡山市保健課・日本食品衛生協会 福島県郡山市、2014 年 10 月 21 日
- 10) 片山和彦 感染研公開 クイズ・これであたかもノロ博士 感染研戸山庁舎、2014 年 10 月 4 日
- 11) 片山和彦 愛知県感染症予防指導者セミナー ノロウイルスの最近の知見について 愛知県名古屋市、2014 年 8 月 18 日
- 12) 片山和彦 ノロウイルス感染症の高齢者施設における実態と対策 ノロウイルスの最近の流行状況 第 6 回 J 感染制御ネットワークフォーラム 教育セミナー10 宮城県仙台市、2014 年 8 月 23 日
- 13) 片山和彦 メディア意見交換会 “知っているようで知らないノロウイルス” 感染研戸山庁舎、2014 年 7 月 28 日
- 14) 片山和彦 日本ウイルス学会北海道支部 第 48 回夏季シンポジウム “ウイルス研究の基礎から応用への橋渡し” (北海道上川郡美瑛町白金温泉国立大説青少年交流の家) 特別講演 ノロウイルス研究のトピックス、2014 年 7 月 12 日
- 15) 片山和彦 ノロウイルスなんて怖くない 知の広場・シラバス 感染研戸山庁舎、2014 年 6 月 24 日
- 16) 片山和彦、藤井克樹 ロタウイルス感染症とロタウイルスワクチン 講義 対象：横浜市立大学医学部社会予防医学教室 感染研村山庁舎、2014 年 6 月 19 日
- 17) 片山和彦 戸山学習館研修 ノロウイルスなんてこわくない！ 感染研戸山庁舎、2014 年 6 月 13 日

- 18) 染谷雄一 (国際会議出席) Sabin IPV D Antigen  
Content & Potency Harmonization Meeting (PATH  
主催) ワシントン D.C.(米国), 2014 年 9 月 24 日
- 19) 政木隆博. Role of miR-122 in the Hepatitis C Virus  
Life Cycle. 第 8 回 IUHW 国際肝臓セミナー, 東  
京, 2014 年 11 月 17 日