

2. ウイルス第二部

部長 村松 正道

概要

ウイルス第二部は、主として消化器系感染症の原因ウイルスを所掌とし、それらのウイルス及びその感染症の研究、検査、リファレンス業務、サーベイランス、研修、国際協力活動を担当としている。生物製剤検定ではA、B型肝炎ワクチン、不活化ポリオワクチン、ロタワクチンを担当している。

一方、2020年は感染症の歴史という意味では特異な年となった。1月頃より中国武漢で新型コロナウイルス感染症(COVID19)のアウトブレイクが発生し、瞬く間にパンデミックとなった。本邦においては2月初旬で武漢都市封鎖に伴う帰国者チャーター機5機分全員PCR検査や横浜港クルーズ船(乗員3400人)のPCR検査などをはじめとして、全所体制で新型コロナの検査、ワクチン、治療法、診断、疫学に当たる必要が生じた。このうちウイルス第二部は、戸山の三、四室は、戸山PCR検査チームの一角を分担し、1,2,5室は村山PCR検査チームを支えた。また四室、渡士主任研究官のチームは、治療法開発のうち抗ウイルス剤のスクリーニングを担当し成果をあげた。以下、多くのは2019年の新型コロナアウトブレイク対応以外の平時の活動を紹介する。

第一室は、下痢症ウイルスに関連する基礎研究、リファレンス業務、サーベイランス業務等を担当する。代表的な下痢症ウイルスであるノロウイルスは、慶応大学医学部との共同研究、ならびに、米国ベイラー医科大学との共同研究により、ヒト腸管オルガノイドを用いて安定な培養増殖系が確立され、ウイルス複製機構、病原性発現機構解明に向けた研究が進められるとともに、不活化剤、治療薬、予防薬、ワクチン等の評価系としての応用がされている。第一室は「ノロウイルスリファレンスセンター」機能を有し、地方衛生研究所の協力を得ながら、ノロウイルスのほか、サポウイルス、ロタウイルス等広範な下痢症ウイルスの検査法開発、検査精度維持などに尽力している。これに関連し、種々の下痢症ウイルスの検出マニュアル作成・改訂を行う。特に、ロタウイルスの検出法では、従来よりも多種多様なウイルスを検出する

系を開発し、貢献した。この系により、より正確にロタウイルスの流行状況を把握することができるようになった。

第一室はまた、不活化ポリオワクチン、ロタウイルスワクチンの国家検定業務を担当している。不活化ポリオワクチンのうち、弱毒型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(DPT-sIPV: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)は、不活化ポリオワクチン成分の力価試験(ラット免疫原性試験)を実施するとともに、これらの4種混合ワクチンに用いる中間段階試験品(不活化ポリオ3価混合原液)の国家検定試験として不活化試験を実施する。強毒株に由来するソークワクチンは、単独不活化ポリオワクチン製剤の他、これを含む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)があり、いずれも国家検定試験としてD抗原含量試験を実施する。一方、ロタウイルスワクチンは、単価の経口弱毒生ロタウイルスワクチンと5価経口弱毒生ロタウイルスワクチンの2種類の製剤の国家検定試験を実施し、含有するロタウイルスワクチン株の力価試験を行う。令和2年10月からロタウイルスワクチンの定期接種が開始される。これに伴い、国家検定対象となるワクチンのロット数の増加が見込まれるため、試験の効率化の作業を進めている。加えて、令和2年4月からロタウイルス感染症流行予測調査事業が開始されることになった。本事業では、感染源調査として、患者便検体中のロタウイルス株の同定を行うことになり、感染症疫学センターとともに検査術式の作成、NESID 端末への入力項目の決定等、準備作業を進めた。

不活化ポリオワクチンの国家検定業務に関連して、国内の品質管理法変更に向けた検討を継続し、セービン株由来不活化ポリオワクチンの国際標準品制定、WHOガイドライン改訂、他国における当該ワクチン開発への協力など国際的な活動を行っている。

第二室は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は残り 3 ヶ国となり、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。一方、WHO 西太平洋地域でも、ワクチン接種率の低いハイリスク地域(ラオス、パプアニューギニア、フィリピン、マレーシア等)では、ワクチン由来ポリオウイルスの流行が発生しており、依然留意が必要とされる。WHO は 2014 年 12 月にポリオウイルス病原体バイオリスク管理に関する新たな WHO 行動指針 (GAP III) を公開した。我が国でも本指針に対応し、ポリオウイルス・バイオリスク管理体制の整備を進めている。

WHO GAPIII に基づくポリオウイルス取扱い施設(PEF)認証の第一段階である認証参加申請を 2019 年 12 月に、厚生労働省に提出した。国内エンテロレファレンスセンターとしてのレファレンス活動を継続し、2018 年 5 月から感染症法による全数報告対象疾患となった急性弛緩性麻痺症例の検査体制整備に向けた取り組みを進めた。

第三室および第四室では 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、分担研究者、拠点病院と連携して全国の県、市町村にて、肝炎ウイルス検査陽性者をフォローアップしている。厚生労働省肝炎総合対策推進国民運動事業「知って、肝炎プロジェクト」と共同して、感染研の一般公開に芸能人を招き、肝炎ウイルス検査の重要性等の広報活動を行った。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開催した。さらに、3 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、新規感染阻害剤を複数同定する成果を挙げた。さらに、ウイルス複製増殖に関わる宿主因子とその機序を明らかにした。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。

第五室は A 型および B 型肝炎ワクチンの検定、検査を担当している。本年度は A 型肝炎ワクチン 1 件、B 型肝炎ワクチン 13 件の検定をおこなった。B 型肝炎ワクチンが平成 28 年 10 月より定期接種化されたため、出検数が大幅に増加している状態が続いていたが、製造メーカー 2 社のうち 1 社の供給が停止したため、前年度に比べて件

数は減少した。肝炎ワクチンは動物を用いた力価試験を実施しているが、試験管内力価試験への切り替えが望まれる。A 型肝炎ウイルスの研究では、分子ウイルス学的研究を開始した。また国内の A 型肝炎の流行状況について継続的な積極的疫学調査による分子疫学的解析を行った。E 型肝炎ウイルスの研究では、様々な遺伝子型の分子クローンを樹立し、動物モデルを確立するとともに、低分子化合物や siRNA ライブラリーのスクリーニング、積極的疫学調査による流行状況の分子疫学的解析を行った。

人事面では、第二室に喜多村晃一博士が任期付研究員(主任研クラス)として着任した。

以下のような国際的技術協力をおこなった。

国際協力に関する業務

第五室

張文靜. 中国山東省輸血研究所。〈中国留学基金派遣〉平成 30 年 12 月～令和元年 12 月、E 型肝炎ウイルスの分子生物学に関する研究

[李天成]

Changwen Ke. 中国広東 CDC. 令和元年 10 月～令和 1 年 11 月、E 型肝炎ウイルスと A 型肝炎ウイルスの検査法に関する研修

[李天成]

Runyu Yuan. 中国広東 CDC. 令和 1 年 10 月～令和元年 11 月、E 型肝炎ウイルスと A 型肝炎ウイルスの検査法に関する研修

[李天成]

Changwen Ke. 中国広東 CDC. 令和元年 4 月～令和元年 6 月日中医学笹川医学奨学金制度 齧齒類動物からウイルス遺伝子の検出の共同研究

[李天成]

研修に関する業務

第五室：

Jean Claude Balingit. 長崎大学 医歯薬学総合研究科 令和元年 11 月、1 回感染性フラビウイルスの作製に関する研修

[松田麻未、鈴木亮介]

行政検査

第二室:

急性弛緩性麻痺疑い症例のポリオウイルス分離検査

1例 2検体

第三室:

体外診断薬承認前試験;

アプティマ HCV (ホロジックジャパン)

アプティマ HBV (ホロジックジャパン)

第五室:

A型肝炎 4件 4検体

B型肝炎 2件 13検体

E型肝炎 6件 8検体

レファレンス業務

第一室:

I. ノロウイルスレファレンスセンター業務

(1) 衛生微生物技術協議会第40回研究会

ノロウイルスレファレンスセンター会議で、活動概要を説明し、ノロウイルス、サポウイルス、ロタウイルスに関する最近の知見を紹介した。

[村上耕介、藤井克樹、岡智一郎、染谷雄一]

サーベイランス業務

I. ロタウイルス感染症流行予測調査事業

(1) ロタウイルスの感染源調査

第一室:

ロタウイルスの感染源調査方法の策定

2020年10月からロタウイルスワクチンの定期接種化が決定されたことに伴い、2020年4月からロタウイルス感染症に関する感染症流行予測調査が実施されることとなった。流行予測調査には感染源調査(病原体調査)と感受性調査(抗体調査)があるが、ロタウイルスに関しては汎用的な抗体検査方法が確立していないため、感染源調査(病原体調査)のみを行うこととした。調査方法について感染症疫学センターと協議して調査対象や方法を決定し、実施要領を作成した。

[藤井克樹、染谷雄一、村松正道]

(2) ロタウイルスの検査術式の作成

ロタウイルスの感染源調査について検査方法を検証し、

その術式を完成させた。調査対象は小児(15歳以下)の感染性胃腸炎患者とし、採取した便検体からRNAを抽出し、リアルタイムPCRによるスクリーニング(ロタ、ノロ、サポウイルス)を行う。ロタウイルスが検出された検体についてmultiplex-PCRによる遺伝子型判定を行う。また、 10^4 コピー/test以上検出された検体については、国立感染症研究所において次世代シーケンサーによるフルゲノム解析を行い、詳細なウイルス株の解析を行うこととした。完成した検査術式については疫学センターを通して各地方衛生研究所に配布した。

[藤井克樹、岡智一郎、村上耕介、染谷雄一、村松正道]

II. B型肝炎ウイルス感染症流行予測調査事業

第五室:

(1) 流行予測調査に用いる代替検査キットのバリデーション

B型肝炎の流行予測調査はHBs抗原、HBs抗体、HBc抗体の測定を実施していたが、次年度からはHBs抗体の測定のみに変更された。調査に指定していたSIEMENS社のELISAキット“Enzygnost Anti-HBsII”が製造停止となり、代替検査キットとしてHBs抗体価の定量が可能な手法キットのうち、XpressBio社の“HEPATITIS B - anti HBs Quantitative (XpB)”についてのバリデーションを行った。既知の抗HBs抗体(国際標準品[NIBSC 07/164]、抗HBs人免疫グロブリン「JB」)および血清パネルについて、各測定キットの測定値を比較した。低濃度ではXpBの測定値が高く出る傾向があったが、抗原性の違いが強く反映されるELISAの特性上許容範囲と考えられた。パネル血清では陰性/陽性の基準となる10mIU/mL付近のグレーゾーンで結果の不一致が認められたが、その他の濃度では判定への影響は否定された。調査の目的を鑑みるとこれまでの検査キットの代替品としてXpBは使用可能と判断された。

[清原知子、鈴木亮介、村松正道]

III. A型およびE型肝炎の流行調査

第五室:

国内で発生したA型肝炎およびE型肝炎の分子疫学調査各地方衛生研究所、保健所と共同で、国内で発生したA型肝炎およびE型肝炎患者検体からウイルスの遺伝子を決定し、分子疫学的解析を行うことにより、国内の発生動向を確認する積極的疫学調査を行っている。

A型肝炎 220検体

E型肝炎 111検体

[杉山隆一、清原知子、李天成、松田麻未、石井孝司(品質保証・管理部)、村松正道、鈴木亮介]

品質管理に関する業務

第一室：

I. 不活化ポリオワクチンの品質管理

Ms. MiSook Yang (韓国 NIFDS) に対し、令和元年 6 月 26 日、27 日にセービン株由来不活化ポリオワクチン力価試験に関する研修を行った。]

[染谷雄一、村上耕介、藤井克樹]

]

業績

調査・研究

I. 下痢症ウイルスに関する研究

1. ノロウイルスに関する研究

(1) ヒトノロウイルス RNA 依存的 RNA ポリメラーゼ (RdRp) の鋳型特異的 in vitro RNA 合成

構築した RdRp の in vitro RNA 転写活性測定系を用いて、RdRp の鋳型 RNA 特異性を調べた。その結果、ゲノム RNA の鎖の 3' 末端 31nt を欠失させると RdRp の転写活性が無くなった。更にこの配列を、RNA を合成しない鋳型 RNA の 3' 末端に繋げたところ、鋳型として働くようになった。従ってこの配列がヒトノロウイルス+鎖ゲノム RNA 合成に必要十分であることが示唆された。

[下池貴志、村松正道]

(2) ヒト型抗ノロウイルスフェージ抗体の性状解析

ノロウイルス VLP を抗原に用い、ヒト由来フェージ抗体ライブラリーをスクリーニングし、遺伝子型特異的、遺伝子群内交叉反応性、遺伝子群間交叉反応性のヒト型抗ノロウイルス抗体を単離した。各抗体の性状解析として、Surface Plasmon Resonance 解析機器を用いたノロウイルス VLP とヒト型抗体間の Affinity の評価を進めている。

[白土東子、守口匡子 (藤田医科大学)、奥野良信 (阪大微研)、黒澤良和 (藤田医科大学)]

(3) ノロウイルスの急激な感染拡大のメカニズムの解明

ノロウイルス流行株の疫学解析と血液型抗原への結合能の in vitro における解析を両立させた研究を進めている。現在は注目されていない、疫学的に劣勢な遺伝子型であっても、血液型抗原結合能の変異により流行株になりうるという証拠の提示は、ノロウイルスに対する公

衆衛生戦略を策定する上で大きな意義がある。

[白土東子、佐野大輔 (北海道大学)、中込とよ子 (長崎大学)、中込治 (長崎大学)]

(4) ヒトノロウイルス感染細胞のトランスクリプトーム解析

腸管オルガノイドへのヒトノロウイルス感染に伴う宿主の遺伝子発現変動を評価するため、ウイルス感染、非感染細胞の RNAseq 解析を行った。その結果、感染後 24 時間において、未感染細胞と比較して、自然免疫を担うインターフェロン産生経路に関わる遺伝子群の発現上昇が認められた。

[林豪士、村上耕介、山岡曜子、村松正道]

(5) 腸管オルガノイドへの siRNA 導入法の検討

ヒトノロウイルス感染を規定する宿主因子を探索するための迅速かつ簡便な系を確立することを目的として、腸管オルガノイドへの siRNA 導入法を検討した。2D 培養した腸管オルガノイドへリポフェクション法により siRNA を導入したところ、標的遺伝子の発現量が 60-75% 程度減少した。今後、系の最適化を随時行いつつ、ウイルス感染に関わる宿主因子を探索していく。

[林豪士、村上耕介、山岡曜子、村松正道]

(6) 腸管オルガノイドへの遺伝子導入法の検討

特定の宿主遺伝子を欠損あるいは改変した腸管オルガノイドを作製する系を確立するために、オルガノイドへの遺伝子導入法を検討した。GFP 発現プラスミドをエレクトロポレーション法により腸管オルガノイドへ導入したところ、30-50%程度の細胞が GFP 陽性であったことから、系が確立できたといえる。また、ウイルスベクターを用いた遺伝子導入法についても mCherry 発現レンチウイルスベクターを用いて確立した。

[林豪士、村上耕介、山岡曜子、村松正道]

(7) ヒトノロウイルス培養系に供する腸管オルガノイドの培養条件の最適化

腸管オルガノイドを用いたヒトノロウイルス培養系に使用する成長因子等の試薬は高価であったことから、運用コスト削減を目指した検討を行った。いくつかの成長因子を組換えタンパク質に置き換え、さらに細胞の支持体となるマトリゲルを希釈することで、培養に係るコストを 1/10 に下げること成功した。また、コスト削減前後で腸管オルガノイドのヒトノロウイルスへの感受性に差は見られないことも確認した。[平石依里、山岡曜子、村上耕介]

(8) ヒトノロウイルス GII.3 の腸管オルガノイドへの感染メカニズムの解析

GII.3 ノロウイルスのオルガノイドへの感染における胆汁酸の機能を解析したところ、胆汁酸が 1) エンドサイトーシスの促進, 2) エンドソーム酸性化の誘導, 3) 頂端側細胞膜におけるセラミドレベルの増加を引き起こすことを見出した。さらに、GII.3 ノロウイルスがこれらの細胞活動の変化を利用して細胞に侵入することを明らかにした。[村上耕介, Tenge VR, Karandikar U, Lin SC, Estes MK (バイラー医科大学)]

(9) マウスノロウイルスの粒子構造変化の解析

マウスノロウイルスの粒子構造を低温電子顕微鏡で解析した結果、2つの粒子構造を有することが示された。さらに、溶液の pH と金属イオン濃度によって構造が切り替わること、構造によって細胞への感染性が異なることが明らかになった。ウイルス学的な意義として、免疫システムを回避するためであると推測された。[Song C, 村田和義 (生理学研究所), 戸高玲子, 村上耕介, 片山和彦 (北里大学)]

(10) ノロウイルス VLP の X 線結晶構造解析

ノロウイルスチバ株 (GI.4) の VLP を組換えバキュロウイルスを感染させた昆虫細胞より調製した。高輝度光科学研究センターにおいて VLP の三次元結晶化、X 線結晶構造解析を行い、構造精密化を進めている。

[染谷雄一: 長谷川和也、熊坂崇 (高輝度光科学研究センター)]

(11) ノロウイルス VLP の電子顕微鏡単粒子解析

ノロウイルス GI 株の VLP を組換えバキュロウイルスを用いて昆虫細胞で調製した。理化学研究所において電子顕微鏡単粒子解析を実施し、三次元立体構造の精密化を進めている。

[染谷雄一、染谷友美 (理化学研究所)]

(12) ノロウイルス VLP と抗体複合体の電子顕微鏡単粒子解析

ノロウイルス GI 株 VLP と特異抗体複合体の電子顕微鏡単粒子解析を実施し、三次元立体構造情報を得、精密化を進めている。

[染谷雄一、染谷友美 (理化学研究所)]

2. サポウイルスに関する研究

(1) サポウイルス核酸検出系の高精度化、迅速化に関する研究

る研究

サポウイルス検出のための RT-PCR 系は複数存在するが、各遺伝子型への反応性が実験的に確認されていないため、現在国内外で多く使用されている PCR プライマーセットについて、合成遺伝子を用いて現在報告がある 18 遺伝子型に対する反応性を検証した。その結果、合計 6 種類のプライマーを含む PCR 系のみ全遺伝子型を検出できることが示された。より少ないで全遺伝子型を検出可能なプライマーセットも見出した。さらに、サポウイルス遺伝子をより迅速に増幅できる PCR 条件も検討した。

[岡智一郎、高木弘隆 (バイオセーフティ管理室)]

(2) 台湾で検出されたサポウイルスの遺伝子解析

台湾 CDC において急性胃腸炎症状を伴う集団事例、入院事例患者糞便から検出されたサポウイルスについて、昨年度構築したより高精度なサポウイルス核酸定量検出系での検出、構造タンパク質コード領域配列の決定を行った。成人集団事例から検出された世界的に報告が稀な GII.8 株については NGS と 5-RACE 法を組み合わせる初めとなる全ゲノム配列を決定した。

[岡智一郎、Doan YH (東京医科歯科大), 郭庭佑、吳芳姿 (台湾 CDC)]

(3) ヒトサポウイルス増殖系に関する研究

急性胃腸炎患者糞便中のヒトサポウイルスの増殖が可能な細胞株と培養条件、および適切なサプリメント (胆汁酸) の選定を行い、2 つの遺伝子型についてウイルス RNA を約 10^8 copies/0.1ml まで増殖させることに成功した。サポウイルスの増殖は、培養上清中のウイルス核酸定量に加え、培養細胞内でのウイルス非構造、構造タンパク質、ウイルスゲノム複製に伴う dsRNA の免疫染色による検出、培養上清中のウイルスタンパク質のサンドイッチ ELISA による検出、培養上清中のウイルス粒子の電子顕微鏡観察によって確認した。さらに、ヒトサポウイルスの加熱、紫外線照射に対する抵抗性も検証した。

[高木弘隆 (バイオセーフティ管理室)、岡智一郎、下池貴志、片岡紀代 (感染病理)、野田衛 (国立医薬食研)、斎藤博之 (秋田県保健環境センター)、小林孝行 (福岡県保健環境研究所)、高橋知子 (岩手県保健環境研究センター)、辰巳智香 (島根県保健環境科学研究所)]

(4) 生活排水からの下痢症関連ウイルス検出に関する研究

生活排水中のサポウイルスについて、4 つの遺伝子群 (GI, GII, GIV, GV) 別の検出系を用いることにより、同時期に多様な遺伝子群が環境中に存在することを明らか

にした。

[高木弘隆 (バイオセーフティ管理室)、岡智一郎、坂上亜希恵、植木洋 (宮城県保健環境センター)]

(5) 豚、イノシシから検出されたサポウイルスの遺伝子解析

豚、イノシシ糞便から次世代シーケンサーによって検出された GIII, GV, GVI, GVII, GX, GXI に分類されるサポウイルスのうち、全長ゲノムの報告がない GX, GXI について NGS と 5RACE 法を組み合わせて全ゲノム配列を決定し、ヒト由来株との類似性を検証した。下痢症との関連が知られる RNA ウイルスのうち、トロウイルス、ポサウイルスの特徴的な株についても全ゲノム配列を決定した。

[長井誠、須永藤子 (麻布大)、水谷哲也 (東京農工大)、岡智一郎]

3. ロタウイルスに関する研究

(1) 北海道におけるロタウイルス分子疫学研究

2019 年北海道ロタウイルス検体の収集

札幌医科大学との共同研究で、北海道における A 群ロタウイルス (RVA) 流行株を調査するため、2019 年に北海道各地の医療機関で採取された RVA 胃腸炎症例の便検体を収集した。砂川市立病院 (砂川市)、留萌市立病院 (留萌市)、岩見沢市立総合病院 (岩見沢市)、NTT 東日本病院 (札幌市)、札幌北辰病院 (札幌市)、苫小牧市立病院 (苫小牧市)、製鉄記念室蘭病院 (室蘭市)、市立函館病院 (函館市)、なかた小児科 (札幌市) の 9 か所から、それぞれ 1、7、1、11、6、3、1、13、21 検体 (合計 64 検体) の RVA 陽性検体を収集することができた。

[藤井克樹、津川毅 (札幌医科大学)]

(2) 2019 年北海道のロタウイルス検体の NGS 解析

2019 年の 64 検体について次世代シーケンサーにて全ゲノム解析を行い 54 検体の解析に成功した。RVA の遺伝子型分布は Wa-like G1P[8] が 24.1%、G2P[4] が 3.7%、G8P[8] が 20.4%、G9P[8] が 50.0%、混合感染が 1.9% であり、G9P[8] が半数を占めていた。G9P[8] のうち 30% が lineage 3、70% が lineage 6 であり、G9P[8] のうち 40% (全体の 20.4%、全て lineage 6) は NSP4 遺伝子が E2 型に入れ替わったモノリアソータントウイルスであった。また、G1 は系統解析により、昨年流行した G1-E2 株とは大きく異なる事が判明した。

[藤井克樹、津川毅 (札幌医科大学)]

(3) 希少な G15 型ロタウイルスのフルゲノム解析

2017 年札幌市中心に位置するにひら小児科医院にて、希少な G15 型 RVA が 1 例検出されたので、次世代シーケンサーにて全ゲノム解析を行った。その結果、遺伝子型構成は G15-P[14]-I2-R2-C2-M2-A13-N2-T9-E2-H3 であり、ウシ RVA に近い配列を持つことが判明した。BLAST 検索で最も近い配列は 2013 年に日本でウシから検出された Tottori-SG 株 (AB853895) で相同性は 95% だった。NSP1 遺伝子は希少な A13 型であり、1983 年米国でウシから検出された B223 株 (LC133553) に比較的近かった (92%)。家族内発症者の情報はあがるが、検体は採取されていない。[藤井克樹、津川毅 (札幌医科大学)]

4. 秋田県におけるロタウイルス分子疫学研究

(1) 2019 年秋田県ロタウイルス検体の収集

秋田大学との共同研究で、秋田県における RVA 流行株を調査するため、2019 年に秋田県由利本荘市の由利組合総合病院で採取された急性胃腸炎による入院症例の便検体を収集した。当該病院の小児科では、2019 年の RVA 流行シーズンに 61 例の急性胃腸炎による入院症例があり、年齢区分としては 5 歳未満が 34 名、5 歳以上が 27 名であった。このうち 51 例から便検体を採取し、リアルタイム PCR 法により検査を行ったところ、10 例から RVA が検出された。RVA 陽性の 10 例のうち 1 例が 5 歳未満、9 例が 5 歳以上であり、低年齢児では陽性数が少ないことから、RVA ワクチン接種の効果が示唆された。

[藤井克樹、野口篤子 (秋田大学)]

(2) 秋田県のロタウイルス検体の NGS 解析

2019 年の秋田県の RVA10 検体について、次世代シーケンサー (NGS) を行い全ゲノム配列を解析した。RVA の遺伝子型分布は G2P[4] と G9P[8] が 5 検体 (50%) ずつであった。G9P[8] のうち 1 検体 (全体の 10%) が lineage 3、4 検体 (全体の 40%) が lineage 6 であり、いずれも NSP4 遺伝子が E1 型の典型的な Wa 型遺伝子型構成であった。それぞれのウイルス株は日本国内の他の地域で流行している株と類似していたが、詳細な系統解析の結果からは、G2、G9 共に複数のクラスタに分類されることが明らかとなっている。重症度との関連性は不明である。

[藤井克樹、野口篤子 (秋田大学)]

(3) 千葉県におけるロタウイルス分子疫学研究

2019 年千葉県ロタウイルス検体の収集

東京女子医大八千代医療センターとの共同研究で、千葉県における RVA 流行株を調査するため、2019 年に同病院において採取された急性胃腸炎による入院症例の便検体を収集した。当該病院の小児科では、2019 年の RVA 流

行シーズンに 31 例の RVA 胃腸炎による入院症例があり、年齢中央値は 3 歳、ワクチン接種例は 6 例であった。このうち研究同意の得られた 26 例について便検体を採取し、詳細な遺伝子解析を行った。

[藤井克樹、濱田洋通 (東京女子医科大学)、廣瀬翔子 (東京女子医科大学)、藤森誠 (東京女子医科大学)]

(4) 千葉県のコタウイルス検体の NGS 解析

2019 年に採取された千葉県の RVA26 検体について、次世代シーケンサー (NGS) を行い全ゲノム配列を解析した。RVA の遺伝子型分布は G1P[8] が 1 例 (4%)、ウマ様 G3P[8] が 1 例 (4%)、G8P[8] が 14 例 (56%) と G9P[8] が 9 検体 (36%) であった。G9P[8] のうち 1 検体 (全体の 4%) が lineage 3、3 検体 (全体の 12%) が lineage 6 の G9P[8]-E1、5 検体 (全体の 20%) が lineage 6 の G9P[8]-E2 であった。1 例は解析不可だった。G1P[8] の配列はロタリックスと一致したため、ワクチンの副反応による胃腸炎であると考えられた。

[藤井克樹、野口篤子 (秋田大学)]

(5) リアルタイム PCR によるロタウイルス検出方法の検討

リアルタイム PCR 用プライマー・プローブセットの検討
これまで、RVA を検出・定量するためのリアルタイム PCR 用プライマー・プローブセットとしては、Freeman らのグループが報告したもの (J Med Virol. 2008, 80(8):1489-96) と、Jothikumar らのグループが報告したもの (J Virol Methods. 2009, 155(2):126-31) の 2 種類があり、いずれも世界中で利用されてきた。両者の性能の違いを臨床検体を用いて検討したところ、Jothikumar らのプライマー・プローブセットでは、AU-1 型 (T3 型) 株やロタテックワクチン (T6 型) が検出不可であることが判明した。

[藤井克樹]

(6) リアルタイム PCR に用いるサンプルの調製条件の検討

リアルタイム PCR で RVA を検出する際に、臨床検体 (便検体) からサンプル調製 (RNA 抽出) する最適な条件を検証した。リアルタイム PCR は Freeman らのプライマー・プローブセットを用いた。RNA 抽出キットは、Qiagen 社の製品よりも ZYMO Research 社の製品 (TRIzol LS を用いる方法) の方が高いコピー数が検出される傾向が見られた。この差は検体によって異なるが、1000 倍程度の差が出る例も見られたため、RNA 溶液に持ち込まれた PCR 阻害物質の影響である可能性が考えられた。また、DNase

処理により検出感度が 1/100 程度まで低下することが判明した。

[藤井克樹]

5. その他の下痢症ウイルスに関する研究

(1) ヒトパレコウイルス感受性決定細胞因子の検索

下痢症便検体からのウイルス増殖能スクリーニング時に、顕著な細胞壊死が確認され、解析の結果ヒトパレコウイルス 3 型と判明した。未確定である当該ウイルスのレセプター解析にむけ、CRISPR/Cas9 ゲノムワイドノックアウトレンチウイルスライブラリーを用いてウイルス不感受性となった細胞と、次世代シーケンサーによる解析を組み合わせ、ウイルス感受性を決定する細胞因子を検索した。

[岡智一郎、高木弘隆 (バイオセーフティ管理室)、斎藤博之 (秋田県保健環境センター)]

II. エンテロウイルスに関する研究

1. 実験室診断およびレファレンス活動

(1) 国内エンテロウイルスレファレンスセンターとしての活動

レファレンスセンターとしてエンテロウイルス標準株と標準抗血清を保管し、要望に応じて地方衛生研究所等に配付した。2019 年度は、抗血清を 6 地衛研 (29 種類)、ウイルス標準株等を 2 地衛研 (2 種類)、細胞を 3 地衛研 (5 種類) に配布した。

[吉田 弘、有田峰太郎、西村順裕、清水博之]

(2) 「検査プロセスの改善 (KAIZEN) に向けたワークショップ」の開催について

病原体検査の質管理に関わる研修を全国レベルで水平展開を行うべく、衛生微生物技術協議会を活用した「検査プロセスの改善 (KAIZEN) に向けたワークショップ」を企画し、運営上の課題点、有用性について検討を行った。ワークショップはファシリテーター 6 名、15 施設より 18 名が参加し、グループワーク形式で実施した。その結果、継続的に実施するためには、ファシリテーターの研修及び確保とともに、研修プログラム、マニュアル開発の必要性が認められた。参加者に対し事後アンケートを行ったところ、ブレインストーミングによる意見交換は問題解決法の研修として効果的と考えられるが、具体的な評価手法の開発が今後の課題である。

[濱崎光宏 (福岡県保健研)、松岡由美子、近藤芳樹 (熊本市環総セ)、吉田弘 (感染研)、調恒明 (山口県環総セ)]

(3) 環境水サーベイランスにより検出されたエンテロウイルス (2017 年度報告)

2017 年 1 月から 2018 年 3 月の間、環境水調査により検出されたエンテロウイルス (EV) の結果と感染症発生病動向調査による EV 検出報告と比較、検討を行った。検出地点と延べ検出月数が特に多い EV は、エコーウイルス 6 (E6) と E3 である。これらの 2 種類は 18 地点のうち 16 箇所検出された。検出月数は E6 が延べ 114 月、E3 は延べ 91 月であった。逆に、報告地点数(検出月数)が少ないものは CB1 が 2 地点(4 月)、E18 が 2 地点(3 月)、E30 が 2 地点(2 月)であった。E6 と E3 は感染症発生病動向調査でも検出報告が多く、これらのウイルスは長期間かつ広範囲に流行していた可能性を示唆している。

[後藤明子(北海道衛研)、高橋雅輝(岩手県環保研セ)、筒井理華(青森県環保セ)、熊田裕子(福島県衛研)、西澤佳奈子(長野県環保研)、堀田千恵美(千葉県衛研)、大沼正行(山梨県環保研)、小澤広規(横浜市衛研)、板持雅恵(富山県衛研)、伊藤雅(愛知県衛研)、葛口剛(岐阜県環保研)、中田恵子(大安研)、中野守(奈良県環保研セ)、濱島洋介(和歌山県環保研セ)、三好龍也(堺市衛研)、梶原香代子(岡山県環保セ)、諸石早苗(佐賀県環保研セ)、芦塚由紀(福岡県環保研)、吉田弘(感染研)]

2. WHO Global Specialized Polio Laboratory (GSL)としての活動

(1) National Polio Laboratory が存在しないラオスおよびカンボジアの National Polio Laboratory として実験室診断を行った。2019 年度はカンボジア 106 検体およびラオス 115 検体の糞便からポリオウイルスの分離および同定を行った。ラオスの糞便検体から 3 型ポリオウイルス 2 株が検出されたが、型内鑑別試験の結果、ワクチン株(Sabin 株)と同定された。

[吉田 弘、有田峰太郎、西村順裕、和田純子、牛村英里、清水博之]

(2) パプアニューギニアにおける 1 型ワクチン由来ポリオウイルスの流行

パプアニューギニア(PNG)では、2000 年の WHO 西太平洋地域のポリオ根絶宣言以来、ポリオ流行は発生していなかった。2018 年 4 月 25 日に麻痺を発症したモロベ州ラエの 6 歳児より、1 型 VDPV が検出され、PNG22 州のうち 9 州で 26 例の確定症例が確認された。PNG における VDPV1 流行に対応し、流行地・ハイリスク地域における VDPV1 伝播を検出するため環境サーベイランスを実施した。フィリピン RITM において、PNG 環境検体からのウイルス分離および型内鑑別試験を実施し、感染研で 1 型ポリオウイルス分離株の VP1 塩

基配列解析を担当した。3 箇所の環境水サイトに由来する検体から、7 株の cVDPV1 が検出された。2018 年 10 月 18 日以降、cVDPV1 によるポリオ症例の発症は報告されておらず、PNG における cVDPV1 伝播は終息したものと考えられる。

[吉田 弘、有田峰太郎、西村順裕、Doan Hai Yen、和田純子、清水博之、Mathias Bauri (Papua New Guinea)、Bruce R. Thorley (VIDRL)、Lea Necitas G. Apostol (RITM)、Yoshihiro Takashima (WHO/WPRO)]

(3) フィリピンおよびマレーシアにおける 1 型および 2 型ワクチン由来ポリオウイルスの大規模流行

フィリピンでは、AFP サーベイランスを補完するため、2017 年より環境サーベイランスを開始し、フィリピン RITM でポリオウイルス分離・同定を実施している。RITM における型内鑑別試験の結果、非ワクチン株ポリオウイルスと同定された検体、および、すべての 2 型ポリオウイルス株について、感染研において VP1 塩基配列解析による確認検査を実施している。2019 年 7 月以降、マニラ市内の複数のサイトで採取された環境由来検体から、1 型および 2 型ポリオウイルスが分離され、VP1 遺伝子解析の結果、1 型は Sabin 1 株から 3.5%以上、2 型は Sabin 2 株から 6.8%以上の塩基置換を有するワクチン由来ポリオウイルス(VDPV)株が複数同定された。フィリピン全土における強化サーベイランスの結果、マニラおよび周辺地域の環境水検体から、VDPV1 および VDPV2 が継続的に検出された。さらに、ミンダナオ島を中心とした広範な地域において AFP 症例が多数報告され、多くの症例からマニラの環境検体由来株と分子系統学的関連性を有する VDPV2 株が検出された。これらの結果より、フィリピンでは、cVDPV1 および cVDPV2 が長期間伝播しており、2019 年後半以降、cVDPV1 および cVDPV2 によるポリオ流行が顕在化したことが明らかとなった。cVDPV1 および cVDPV2 によるポリオ流行をコントロールするため、フィリピンでは bOPV および mOPV2 による強化接種キャンペーンが実施され、cVDPV1 は 2019 年 12 月以降、cVDPV2 は 2020 年 2 月以降、AFP 症例および環境検体から検出されていない。一方、フィリピンの cVDPV1 および cVDPV2 と分子系統学的関連性を有する VDPV 株が、2019 ~2020 年にかけてマレーシアでも検出されており、ハイリスク地域における cVDPV 伝播が危惧されている。

[有田峰太郎、西村順裕、吉田 弘、喜多村晃一、和田純子、牛村英里、清水博之、Bruce R. Thorley (VIDRL)、Lea Necitas G. Apostol (RITM)、Varja Grabovac、Yoshihiro Takashima (WHO/WPRO)]

(4) 2019 年 6 月 11 日~13 日に、Starling Hotel (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 に

参加し、世界ポリオ根絶最終段階における世界ポリオ実験室ネットワークの技術的課題について検討した。培養細胞を用いたウイルス分離に替わる検体からのポリオウイルス遺伝子直接検出法の検証と導入、国際的試薬供給システムの導入、各種検査の精度管理、等について検討した。また、ポリオウイルス環境サーベイランスの標準化、ポリオ実験室ネットワークにおけるポリオウイルス病原体バイオリスク管理の導入、ポリオ実験室マニュアルの改訂作業等を行った。

[清水博之]

(5) 2019年10月29日～31日に、CDC(アトランタ、米国)で開催されたWHO meeting of the Ad Hoc Small Working Group on Improving Polio Laboratory Diagnosticsに参加し、ポリオ実験室診断におけるGAPIII対応、糞便検体からのポリオウイルス直接検出法の進捗、cVDPV2 流行拡大の現状と課題等に関する技術的検討を行った。

[清水博之]

(6) 2019年11月6日～7日に、スイス、ジュネーブのスターリングホテルで開催されたThe 24th Polio Research Committee Meetingに参加し、西太平洋地域におけるVDPV流行の現状とVDPV遺伝子解析の結果、感染性ポリオウイルスを使わない中和抗体価測定法等ポリオ根絶計画に関連した国内研究の進捗報告を行った。

[清水博之]

(7) 2019年11月12日～14日に、カンボジア、シエムリアップで開催された第25回西太平洋地域ポリオ根絶認定地域委員会会議に参加し、WHO西太平洋地域で拡大しているcVDPV2 流行の現状と課題等に関する検討を行った。日本ポリオ根絶会議の年次報告書の内容を中心に、本会議発表資料の作成を担当した。

[清水博之]

(8) 2020年2月14日～15日に、WHO西太平洋事務局で開催されたThe informal consultation on future polio vaccination schedule in the Western Pacific Regionに参加し、世界的およびWHO西太平洋地域におけるVDPV流行の現状、とくに、フィリピンおよびマレーシアで現在発生している1型および2型VDPVによるポリオ流行の現状を踏まえたアウトブレイク対策を検討した。WHO西太平洋地域におけるVDPV流行発生のリスク要因を踏まえ、現在および将来的なポリオワクチン戦略のオプション(bOPV、mOPV2、IPV、Sabin-IPV、nOPV等)を検討した。

[清水博之]

(9) 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 25th 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]

3. WHO 西太平洋地域における2019年のポリオウイルス分離状況

(1)2019年度にラオスおよびカンボジアから送付されたAFP症例由来糞便検体221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。ラオスの糞便検体から3型ポリオウイルス2株が検出されたが、型内鑑別試験の結果、ワクチン株(Sabin株)と同定された。

パプアニューギニア、モロベ州の6歳児より、1型VDPVが検出され、その後、9州で26例の確定症例が確認された。2019年度も継続して、環境サーベイランス由来の1型ポリオウイルスのVP1遺伝子解析を実施したが、VDPV1株は検出されなかった(環境検体からの最後の検出は2018年11月)。

2019年7月以降、マニラ市内の複数のサイトで採取された環境由来検体から、1型および2型ポリオウイルスが分離され、VP1遺伝子解析の結果、1型はSabin1株から3.5%以上、2型はSabin2株から6.8%以上の塩基置換を有するワクチン由来ポリオウイルス(VDPV)株が複数同定された。52検体の環境由来1型ポリオウイルス分離株のうち、32株がVDPV1と同定された。また、AFP症例から4株のVDPV1が、接触者から2株のVDPV1が検出された。150検体の環境由来2型ポリオウイルス分離株のうち、67株がVDPV2と同定された。AFP症例から73株のVDPV2が、接触者から2株のVDPV2が、健常者から8株のVDPV2が検出された。

[有田峰太郎、西村順裕、喜多村晃一、清水博之]

4. 世界ポリオ根絶計画に関わる研究

(1) OSBP阻害剤T-00127-HEV2のOSBP活性阻害機構の解析

これまでに同定したOSBP阻害剤T-00127-HEV2のOSBP阻害活性の解析を行った。その結果、T-00127-HEV2は、OSBPのホスファチジルイノシトール4-リン酸(PI4P)輸送活性は阻害せずに、コレステロール輸送活性のみを阻害することが明らかにされた。

[有田峰太郎、Joëlle Bigay (Université Côte d'Azur, CNRS, Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire, France)]

(2) PI4KB ノックアウト細胞で増殖できるポリオウイルス変異株の分離

PI4KB ノックアウト細胞で増殖できるポリオウイルス変異株を分離した。興味深いことに、部分的非依存性を与える変異と依存性を高める変異が同時に存在することが、ほぼ完全な非依存性に必要であることが判明した。本研究の結果は、宿主経路の阻害に対するウイルスの進化過程に新しい知見を与え、将来的には抗ウイルス治療における耐性ウイルスの出現を制御出来る技術の開発につながることを期待される。

[有田峰太郎, Joëlle Bigay (Université Côte d'Azur, CNRS, Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire, France)]

(3) 疑似ウイルスを用いた抗ポリオウイルス中和抗体価測定系の開発

これまでに野生株のカプシドを持ったポリオウイルス疑似ウイルスを作製し、抗ポリオウイルス中和抗体価の測定を行っていたが、1型ポリオウイルスに対しては、ワクチン株と野生株で抗原性が大きく異なり、ワクチン株に対する中和抗体価を正確に測定することが出来ないことが示されていた。そこで、ワクチン株(Sabin株)のカプシドを持った疑似ウイルスを作製し、中和抗体価の測定を行った。その結果、1型ワクチン株の生ウイルスを用いた測定結果と、1型ワクチン株カプシドを持った疑似ウイルスを用いた測定結果は、高い相関を示すことが示された。今回開発した系は、生ウイルスを使わない中和抗体価測定法の一つとして利用されることが期待される。

[有田峰太郎, 板持雅恵(富山県衛生研究所 ウイルス部)]

(4) フィリピンで流行している2型ワクチン由来ポリオウイルスのNGS解析

フィリピンで2019年9月より流行している2型ワクチン由来ポリオウイルス(cVDPV2)について、より詳細かつ網羅的な分子疫学情報を得るために次世代シーケンシング(NGS)を用いた全長ゲノム配列解析を新たに立ち上げた。AFP症例由来検体及び環境検体からランダムPCR法をベースとしたNGS解析を行った。得られた塩基配列は従来のサンガー法によるVP1領域塩基配列と99%以上の同一性があり妥当性が確認された。解析結果からウイルス伝播状況、ゲノム組換えの有無、中和抗原部位の変異について検討を進めている。

[喜多村晃一, Doan Hai Yen (東京医科歯科大学), 西村順裕, 有田峰太郎, 清水博之]

(5) 免疫不全患者から検出された2型ワクチン由来ポリオウイルスのゲノム解析

2019年に報告されたcVDPV2によるポリオ流行との関連

性は不明ながら、2019年9月フィリピンの免疫不全患者から2型ワクチン由来ポリオウイルス(iVDPV2)が同定された。その後、本症例から継続してiVDPV2が検出されたことから、世界でも稀なiVDPV2長期持続感染症例であることが明らかとなった。サンガー法によるVP1領域配列決定及びNGS解析により、このiVDPV2と流行中のcVDPV2との比較を行ったところ、分子系統学的には両者は関連性が低いことが示唆された。

[喜多村晃一, Doan Hai Yen (東京医科歯科大学), 西村順裕, 有田峰太郎, 清水博之]

(6) セービンIPVを抗原とした貼るワクチンの開発研究

これまでの一連の検討により、弱毒化Sabin株由来不活化ポリオワクチン抗原含有マイクロニードル製剤(sIPV-MN)は、様々な製剤化検討にも関わらず、複数の免疫原性評価試験において、対照とした従来の注射製剤と比較して2型および3型ポリオウイルスに対する中和抗体誘導能が低い結果が得られている。sIPV-MN製剤の免疫原性が低い理由の解析のため、in vitro抗原量測定試験(D抗原ELISA法)により適切なsIPV抗原量を内包することを確認した型別単価sIPV-MNマウス用製剤を調製し、マウスを用いた免疫原性評価試験を実施した。単価3型sIPV-MN製剤は、3価sIPV-MN製剤同様、中和抗体誘導能は対照とした注射投与群よりも低く、MN製剤化過程における中和抗原性低下は、3価sIPV抗原間の相互作用によるものではないことが示唆された。NM製剤化の過程でsIPV中和抗原性が変化・低下し、標準的なin vitro抗原量測定試験では中和抗原性の変化を検出できないことが確認された。加温sIPV抗原を用いた比較試験では、in vitro抗原量測定試験と免疫原性が必ずしも相関しない場合があること、抗原構造変化による免疫原性への影響が血清型で異なることが明らかとなった。

[小山田孝嘉 (富士フィルム), 落合晋(阪大微研会), 岡田直貴(阪大), 永田典代(感染病理部), 染谷雄一, 清水博之]

5. 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(四種混合ワクチン)累積接種率調査

我が国の定期接種の接種状況を把握する目的で、無作為に抽出した全国の満2歳児5000人と満6歳児5000人を対象として、Hibワクチン、小児用肺炎球菌ワクチン、BCGワクチン、四種混合ワクチン、水痘ワクチン、MRワクチン(第1期、第2期)、日本脳炎ワクチンの累積接種率と経年変化を調査した。2019年調査の結果では、四種混合ワクチン1回目の累積接種率は4か月で94.6%、追加接種は24か月で87.9%であった。IPV含有四種混合ワクチンの接種状況はこ

の3年間で大きな変化はなく良好である。四種混ワクチン第1期初回1回目の累積接種率は、2017-2019年調査のいずれも満7か月までに累積接種率が98%を超えていた。追加接種については満2歳の累積接種率が2017年調査で83.8%、2018年調査で86.6%、2019年調査で87.9%であり、追加接種の接種率の増加傾向が認められた。[崎山 弘(崎山小児科)、城 青衣(都立駒込病院)、梅本 哲(医療産業研究所)、清水博之、鈴木 基(感染症疫学センター)]

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

わが国ではポリオの定期接種に使用されるワクチンが2012年に経口生ポリオワクチンからIPVに切り替わり、現在は3種類のIPV(cIPV、DPT-sIPV、DPT-cIPV)が使用可能である。IPV導入から7年目の2018年度の調査結果によりポリオの予防接種状況・抗体保有状況の現況を検討するとともに、経年的な推移について検討を行った。予防接種法に基づく定期接種対象疾病に関するサーベイランス(感染症流行予測調査)により得られたデータを用いて解析を行った結果、5歳未満児の1回以上接種率(接種歴不明者を除いて算出)は2013年度以降98~100%と高く、2015年度以降はほとんどの者が不活化ポリオワクチンのみの被接種者であった。一方、5歳未満児の抗体保有率(中和抗体価1:8以上、以下同じ)についてみると、1型・2型に対しては2011~2012年度で85~86%であったが、2013~2018年度は95~100%であり、1回以上接種率の上昇にともない抗体保有率も上昇していた。抗体保有率(中和抗体価1:8以上)についてみると、2015年度以降はポリオウイルス1~3型すべてに対して概ね95%以上と高く維持されていた。[佐藤 弘、多屋馨子、鈴木 基(感染症疫学センター)、清水博之]

6. 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) エンテロウイルス71受容体発現のための発現プラスミド作製

エンテロウイルス71の受容体の機能解析のため、FLAGタグおよびHAタグを付加できる発現プラスミドを作製した。まず、pEF1a-IRESプラスミド(クロンテック社)のマルチクローニングサイト1に、FLAGタグ配列、CpoI制限酵素認識配列、Hisタグ配列をクローニングした。続いて、マルチクローニングサイト2にブラストサイジン耐性遺伝子をクローニングした。このプラスミド(pEF-FLAG-CpoI-His-IRES-bsd)により、EF1aプロモーターでタグ付加蛋白質を、IRESでブラストサイジン耐性遺伝子を同時に発現することが可能となった。[西村順裕、清水博之]

(2) 発現プラスミドへのエンテロウイルス71受容体cDNAのクローニング

エンテロウイルス71と相互作用することが報告されている、hWARS、フィブロネクチン、プロヒピチン、ビメンチン、ヌクレオリン等のcDNAをRD細胞cDNAからPCRで増幅し、pEF-FLAG-CpoI-His-IRES-bsdプラスミドにクローニングした。ヌクレオリンcDNAのクローニング効率は非常に低く、クローニングされたcDNAは常に3'末領域に欠損を伴っていた。ヌクレオリンが大腸菌内で低レベルながら発現し、大腸菌の生育に悪影響を与えていることが考えられ、クローニング方法の改善を検討している。

[西村順裕、清水博之]

(3) RD-SCARB2-KO細胞のSCARB2ゲノム配列の解析

ヒトScavenger receptor class B member 2(SCARB2)はエンテロウイルス71の受容体である。RD細胞へのエンテロウイルス71感染機構の解明のため、SCARB2遺伝子のノックアウトをCRISPR/Cas9によって作製し、エンテロウイルス71の感染性が低下することを確認した(昨年度)。この細胞においてSCARB2ゲノムが編集されていることの確認を行った。CRISPR/Cas9のターゲット領域周辺をPCRで増幅しプラスミドにクローニングした。複数のクローンをシーケンシングしたところ、いずれの配列もフレームシフトをおこすゲノム編集が起こっており、ゲノムレベルでのノックアウトを確認できた。

[西村順裕、清水博之]

(4) PSGL-1とチロシン硫酸化酵素に関する研究

エンテロウイルス71の受容体のひとつであるP-selectin glycoprotein ligand-1はアミノ末端領域に硫酸化を受けるチロシンをもつ。この硫酸化がエンテロウイルス71との相互作用に必須である。PSGL-1のチロシン硫酸化を解析するために、Protein-tyrosine sulfotransferaseの発現プラスミドを作製した。さらにこのプラスミドを用いてProtein-tyrosine sulfotransferaseを安定発現させた細胞株を樹立した。この細胞に発現させたPSGL-1はチロシン硫酸化が亢進しており、エンテロウイルス71との相互作用の解析に有用と考えられた。

[西村順裕、清水博之]

(5) エンテロウイルスの複製に必要とされるPI4KB内のドメインの同定

PI4KBはエンテロウイルスの複製に必要とされる宿主因子だが、酵素活性以外に必要とされるドメインがあるか不明であった。PI4KBノックアウト細胞を用いて、複数のドメインを欠損させたPI4KB変異体を外来性に発現させ、エンテロウイルスの複製のレスキューを試みた。その結果、酵素活性に必要と

されないドメイン全て欠損させた PI4KB 変異体 (Δ 3-120, 249-296, 408-507 aa) を発現させても、エンテロウイルスの複製をレスキューできることが判明した。欠損させたドメインには、宿主タンパク ACBD3, RAB11A, 14-3-3, c10orf76 が結合することが知られている。この結果から、PI4KB が発現しさえすれば、これらの PI4KB 結合宿主因子はエンテロウイルスの複製には必要ないことが示唆された。

[有田峰太郎]

(6) 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

ベトナム北部における手足口病症例由来検体からの病原体サーベイランスを実施した。EV-A71 分離株について、より詳細な分子疫学的解析を行い、さらに、手足口病関連ウイルス検出動向を解析した。2017-2018 年の北部ベトナムにおける手足口病症例のうち、約 83% がエンテロウイルス陽性と判定された。2018 年における手足口病の主要な原因ウイルスは EV-A71 (192/362, 約 53%) であった。2018 年に発生した手足口病流行では、5~6 月を中心に患者報告数が増加し、EV-A71 陽性手足口病症例は、他のエンテロウイルスによる手足口病症例と比較して、重症化の頻度が高い傾向が認められた。VP1 領域に基づく分子疫学的解析によると、2017 年の EV-A71 株の多くの遺伝子型は subgenogroup B5 であったが、2018 年に検出された EV-A71 株の多くは、遺伝子型 subgenogroup C4 であった。2014-2017 年の北部ベトナムにおける主要な EV-A71 遺伝子型は subgenogroup B5 であり、C4 の検出頻度は低かったが、2018 年に発生した手足口病流行では subgenogroup C4 の再活性化が認められた。

[Tran Thi Nguyen Hoa (NIHE)、清水博之]

(7) 北部ベトナムにおける EV-A71 以外の手足口病関連エンテロウイルスの解析

ベトナムでは近年、エンテロウイルス A71 (EV-A71) 以外の手足口病関連ウイルスによる手足口病流行が報告されていることから、今年度はとくに、これまで解析が進められてこなかった EV-A71 以外の手足口病関連コクサッキー A 群ウイルス (CV-A2, CV-A4, CV-A10 等) の検出動向を解析した。2012~2017 年において、北部ベトナムの手足口病症例から検出された CV-A10, CV-A4, および CV-A2 株の分子系統解析により、これらの手足口病関連エンテロウイルスの多くは、世界各地で検出されているエンテロウイルスと分子疫学的関連性を有していたが、CV-A2 および CV-A4 では、地域固有の遺伝子型伝播が明らかとなった。また、次世代シーケンズ解析による国内外の CV-A16 および CV-A6 の分子系統解析により、ベトナムにおける CV-A16 および CV-A6 の周期的流行発生機序について解析を行った。ベトナムにおける手

足口病流行の全体像と原因エンテロウイルスの推移を把握するためには、これまで主要な原因ウイルスとされてきた EV-A71 以外の手足口病関連ウイルスの検出動向の監視が必要とされる。

[Tran Thi Nguyen Hoa (NIHE)、清水博之]

(8) VP1-145 アミノ酸によるエンテロウイルス 71 カプシド蛋白質相互作用表面のシス-アロステリック制御機構

EV-A71 をモデルとして、*in silico* 構造解析と実験を組み合わせたカプシドタンパク質構造・機能・変異研究基盤整備を進めた。EV-A71 のウイルス学的性状に関与する VP1-145 変異の効果も構造レベルで解析し、VP1-145 残基が EV-A71 のカプシド構造制御の重要残基であることを見出した。VP1-145 変異は、変異周辺の動的性質の変化を誘導することがわかった。VP1-145 変異は、変異箇所のみならず、カプシドを構成する他のタンパク質のゆらぎにも影響を与えた。VP1-145 変異によりゆらぎの影響が見られた領域には、既知の機能部位 (受容体結合部位) と交代エピトープが含まれていた。以上の結果より、VP1-145 残基は、カプシド構造・機能のアロステリック制御を行う重要部位であると考えられる。

[小谷 治、佐藤裕徳 (感染症ゲノム解析センター)、清水博之]

(9) 急性弛緩性麻痺サーベイランスと検査体制の整備

2018年5月より、AFPが五類感染症全数報告対象疾患となり、国内検査体制の整備が進められている。「急性弛緩性麻痺を認める疾患のサーベイランス・診断・検査・治療に関する手引き」では、糞便検体からのポリオウイルス検査は必須であり、エンテロウイルス A71 や AFP 発症への関与が強く疑われている EV-D68 を含む NPEV についても、可能な限り検査を実施することが推奨されている。そのため、感染研の AFP 検査担当者および地衛研の代表により、AFP 由来検体のポリオウイルスおよび NPEV 検査に関する現状と問題点を整理し、今後の検査の方向性について検討を行った。WHO 標準法によるポリオウイルス検査について、国内唯一の WHO 認定ポリオウイルス実験施設である感染研ウイルス第二部で実施する可能性について検討し、検査実施体制の整備を進めている。

[多屋馨子、藤本嗣人 (感染症疫学センター)、清水博之、村松正道]

(10) 免疫グロブリン (IVIG) 製剤中の抗 EV-D68 中和抗体価抗体価の検討

日本で使用されている免疫グロブリン製剤 9 種類を購入し、2010 年~2015 年に日本で分離された EV-D68 分離株に対する中和抗体価を測定した。9 製剤のうち、7 製剤は日本国内の献血由来、1 製剤はドイツの献血由来、1 製剤は米国の

非献血由来であった。使用した EV-D68 分離株は、2010 年から 2015 年にかけて国内で分離された 6 株で、異なる 3 種類の EV-D68 遺伝型を含む。RD 細胞における EV-D68 による CPE 発現を抑制するのに必要な免疫グロブリン製剤の希釈倍率により、各製剤の抗 EV-D68 中和活性を評価した。9 種類の免疫グロブリン製剤は、いずれも、日本の EV-D68 分離株 6 株に対する中和抗体を有していた。すべての製剤は、256 倍より高い希釈倍率で、EV-D68 中和活性を示したことから、高力価の EV-D68 中和抗体を含むことが明らかとなった。EV-D68 遺伝子型と中和活性に顕著な関連性は認められなかったが、同一遺伝子型に属する EV-D68 株に対して、中和抗体価が明らかに異なる免疫グロブリン製剤が認められた。

[吉田和央(国立循環器病研究センター)、清水博之]

(11) 乳飲みマウスを用いたガンマグロブリン製剤のエンテロウイルス D68 型に対する中和能の検討

2015 年秋に、EV-D68 の大きな流行があり急性弛緩性麻痺との関連が疑われたが、EV-D68 感染症の治療法は確立していない。感染症治療に広く用いられるガンマグロブリン製剤に EV-D68 に対する抗体が含まれているかは不明である。我々は、感染症発生动向調査で収集された検体から、乳飲みマウスを用いて EV-D68 を分離することに成功し、動物実験モデルを構築した。ガンマグロブリンを終濃度 $5 \times 10^{-1} \sim 5 \times 10^{-3}\%$ で反応させた EV-D68 を乳飲みマウスに接種しても麻痺等の所見は認められなかったことから、ガンマグロブリン製剤には EV-D68 に対する十分量の中和抗体が含まれているものと考えられた。

[斎藤博之(秋田県健康環境センター)、清水博之]

7. 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) WHO ポリオウイルス病原体バイオリスク管理行動計画(GAPIII)について

2017 年 6 月現在、1 型野生株ポリオウイルス流行国は、パキスタンおよびアフガニスタンに局限しており、WHO は、世界ポリオ根絶計画の早期達成を目指している。WHO Polio Eradication and Endgame Strategic Plan 2013-2018 では、世界ポリオ根絶達成の要件のひとつとして、ポリオウイルス取扱い施設から地域社会へのポリオウイルス再侵入のリスクを最小限とするための、ポリオウイルスの安全な取扱いと封じ込め活動の徹底を挙げている。そのため、WHO は、2014 年 12 月に、ポリオウイルス病原体バイオリスク管理に関する世界的行動計画改訂第三版である WHO Global Action Plan to minimize poliovirus facility-associated risk after type-specific eradication of wild polioviruses and sequential

cessation of OPV use (GAPIII) を公開し、ポリオウイルス病原体バイオリスク管理の厳格化を求めている。GAPIII では、世界中のポリオウイルス取扱い施設を、診断・研究・ワクチン製造等に関わる必須な機能を遂行するために必要とされる最小限の認証された施設(Essential Poliovirus Facility; PEF)に限定し、これらの施設では、GAPIII に示されたバイオリスク管理標準に準じてポリオウイルスを取扱うことを求めている。感染研でも不要な 2 型ポリオウイルス感染性材料を廃棄し、GAPIII に準拠したワクチン株(Sabin 2 株)を含む 2 型ポリオウイルス感染性材料のバイオリスク管理体制の整備、PEF 施設認証の準備を進めた。

[清水博之]

(2) WHO ポリオウイルス病原体バイオリスク管理行動計画(GAPIII)国内対応

ポリオ根絶最終段階に向けたポリオワクチン戦略の一環として、2016年4月のbivalent OPV導入後は、2型ワクチン株(Sabin2/OPV2株)についても、GAPIIIに基づく病原体管理の対象となる。不活化ポリオワクチン製造および品質管理を実施している国内施設では、PEF候補施設として、GAPIIIに対応したポリオウイルス・バイオリスク管理体制整備を進めている。そのため、国内PEF候補施設におけるバイオリスク管理標準について、技術的評価・検討を進めた。また、不活化ポリオワクチン品質管理において、出来る限り感染性ポリオウイルスを用いない手法を開発するため、sIPV抗原量測定のためのD抗原ELISA試験について、不活化抗原を用いる方法の技術的検討を進めた。

[落合 晋(阪大微研会)、佐藤達記(武田薬品)、中島和幸(化血研(当時))、伊木繁雄、原田俊彦、篠原克明、棚林清(バイオセーフティ管理室)、染谷雄一、清水博之、村松正道]

(3) WHO によるポリオウイルス保有施設認証に向けた調査・検討

ポリオウイルス感染性材料を保管・使用するポリオウイルス基幹施設(Poliovirus Essential Facility; PEF)は、WHO GAPIII-CCS に基づいて NAC による認証を受ける必要がある。そのため、WHO 担当者および国内 NAC 担当者による、PEF 認証に関わる情報共有を行った。GAPIII-CCS の第一段階である認証参加(CP)提出期限が 2019 年 12 月と定められたことから、国内 PEF 施設認証のための準備を進め、2019 年 12 月までに、感染研を含む、すべての国内 PEF 候補施設から CP 申請が提出された。

[棚林清(バイオセーフティ管理室)、染谷雄一、清水博之、村松正道]

(4) 感染症流行予測事業・感受性調査(2型ポリオウイルス中和抗体価測定)への対応

現在、PEF 候補施設として感染性 2 型ポリオウイルスを取扱うことができるのは、ワクチン製造施設を除くと、国内では感染研村山庁舎のみである。これまで、感染症流行予測調査事業におけるポリオウイルス中和抗体価測定は地衛研で実施されてきたが、すべての地衛研で、2 型ポリオウイルスを廃棄したことから、2017 年度調査から、2 型ポリオウイルス中和抗体価測定試験は、感染研ウイルス第二部で実施している。地衛研で、従来通り 1 型および 3 型ポリオウイルスに対する中和抗体価測定を実施し、感染研ウイルス第二部で 2 型中和抗体価測定を行った。2019 年度は、6 地衛研からの 1475 血清検体について、中和抗体価測定を実施し、試験結果を各地衛研に報告送付した。

[有田峰太郎、西村順裕、染谷雄一、清水博之]

(5) ポリオウイルスを含む可能性のある臨床検体・環境検体のバイオリスク評価

糞便、咽頭拭い等の臨床検体、下水等の環境検体もバイオリスク管理の対象となることから、ポリオ・エンテロウイルス以外の腸管感染症の検査・研究施設、インフルエンザ等呼吸器感染症の検査・研究施設でもリスク評価に基づいた検体等の廃棄・管理が必要となる。そのため、広範な施設における検体保有の実態とバイオリスク評価手法について検討を行った。環境検体、細菌検出あるいは腸内微生物叢解析のための糞便材料、およびインフルエンザウイルス等の検出を目的とした呼吸器検体等について、ポリオウイルス・バイオリスク評価を進めた。環境水ウイルスモニタリングを行なっている研究所／研究室で保管している環境水検体のリスクアセスメントによると、Risk Group Levelは高くてもLevel 2 Lowであった。

[小池智(東京都医学研)、佐野大輔(東北大)、飯田哲也(阪大)、西村秀一(仙台医療センター)、棚林清(バイオセーフティ管理室)、清水博之]

(6) WHO-PIMガイダンスによる保有施設調査

ワクチン株を含む感染性ポリオウイルスは、意図や目的の有無に関わらず、臨床検体や環境検体中に含まれる可能性があることから、WHOは、2018年5月に感染性ポリオウイルスを含む可能性のある材料(糞便、呼吸器、環境検体)を取扱う施設を対象としたガイダンス(PIMガイダンス)を公開した。PIMガイダンスの内容を検討し、国内対応を検討するため、WHO資料を精査し和訳版を作成し、作成した和訳資料を用いて、PIM保有施設予備調査を実施した。PIMガイダンス和訳版および調査関連資料の問題点・改善点を抽出するため、予備調査に関するアンケートを作成し回答を依頼した。PIM保有施設予備調査では多くの有用なコメントが寄せられたこと

から、予備調査結果および異なる領域の専門家からのコメントを反映し、調査資料の簡略化を図った。作成した資料を用いて、「世界的なポリオ根絶に向けたポリオウイルスに感染する可能性のある検体等の試料の保持状況に関する調査について」(令和元年8月29日付、厚生労働省健康局結核感染症課事務連絡)による施設調査が実施された。PIM保有施設調査結果の概要は、WHO西太平洋地域ポリオ根絶認定委員会年次報告書の一部としてWHOに提出し、WHO西太平洋地域ポリオ根絶認定委員会会議(2019年11月)において報告した。

[小池智(東京都医学研)、佐野大輔(東北大)、飯田哲也(阪大)、西村秀一(仙台医療センター)、棚林清(バイオセーフティ管理室)、清水博之]

III. 肝炎ウイルスに関する研究

A 型肝炎ウイルス(HAV)に関する研究

(1) A型肝炎の発生動向調査:海外渡航歴の影響について

2015年~2018年に感染症発生動向調査(NESID)に報告されたA型肝炎患者情報を集計し、発症15~45日前までに海外渡航歴がある海外感染疑い例の割合や渡航先、医師により推定された感染源を調査した。海外感染疑い例は全体の2割強であり、国内流行があった年は相対的に減少した。感染地域はHAV常在地である東南アジア、東アジア、南アジアの国が多く、続いて近年流行があった台湾、アメリカ合衆国が挙げられていた。検出された遺伝子型は、世界的に分布し、日本国内でも最も多く検出されるIA、次いで主に南アジアに分布するIIIA、少数ながら中近東・アフリカに分布するIBが検出された。感染源として挙げられた飲食物は海外では魚介類に次いで水、氷、飲料が多かった。流行地への渡航者には、A型肝炎ワクチン接種が強く勧められる。

[清原知子、砂川富正(感染症疫学センター)、鈴木亮介、杉山隆一、村松正道]

(2) レポーター遺伝子を持つHAVを用いた抗HAV低分子化合物の探索

HAVが肝細胞で感染増殖する為に重要な宿主因子を探索する為に、ウイルスゲノム中にルシフェラーゼ遺伝子が挿入されたHAVをHuh7.5.1細胞に感染させ、1280種類の生理活性物質ライブラリーのスクリーニングを実施した。細胞毒性を示さずにHAVの増殖を用量依存的に抑制する化合物を複数得た。同定した化合物の分子標的および作用機序の解析を進めている。

[鈴木亮介、結城(平井)明香(動物管理室)、山根大典(東京都医学総合研究所)、村松正道]

2. B型肝炎ウイルス(HBV)に関する研究

(1) HBV陽性パネル候補検体のHBV配列解析

HBV陽性パネル候補検体30例の血清よりHBVを分離しHBV遺伝子型の同定とHBV遺伝子配列の確認を行った。HBV遺伝子型の同定はイムニスHBVゲノタイプEIA(特殊免疫研究所)を用い、さらにPCR法でHBV遺伝子増幅が可能であった検体は塩基配列を決定の上、遺伝子型の確認を行なった。HBVゲノタイプEIAでは30症例中、遺伝子型A2例、B12例、C11例、D2例、判定不能3例であった。30例中、HBV全長の配列が確認できた症例は18例であり、これらは全てHBVゲノタイプEIAと遺伝子型が一致した。遺伝子型Bの一例でa determinant領域にI126Aの変異が検出された。

[山田典栄、大崎由喜、加藤孝宣]

(2) TAF抵抗性B型慢性肝炎患者の臨床学的特徴の検討

B型慢性肝炎に対する治療薬として核酸アナログであるテノホビル・アラフェナミド(TAF)が使用されている。TAFの投与から1年経過後もHBVDNAが陰性化しない症例が存在し、これらの臨床学的特徴を検討した。TAF投与中の13例を対象とし、その内訳は男性8例、女性5例、投与開始時の平均年齢は41.8±10.5歳であった。HBV遺伝子型はA1例、C12例であり、病態は慢性肝炎11例、肝硬変2例であった。投与開始から1年後もHBVDNAが陽性であった反応不良例は3例であり、そのうち1例は投与開始から15カ月で陰性化し、2例は投与開始から16カ月経過した現在も陰性化していない症例であった。反応良好例と不良例で性別、年齢などの臨床背景およびHBV遺伝子型や治療開始時のHBVDNA、ALT、AST、T-Bilなどの各種臨床検査値に有意差は認めなかった。

[山田典栄、安田清美(清川病院)、加藤孝宣]

(3) TAF抵抗性B型慢性肝炎患者における薬剤耐性変異の解析

核酸アナログであるテノホビル・アラフェナミド(TAF)の投与開始から1年経過後もHBVDNAが陰性化しないB型慢性肝炎症例3例の薬剤耐性変異の解析を行った。治療開始前、開始後の複数ポイントの患者血清よりHBVを分離し、HBVのRT領域をPCRで増幅しダイレクトシーケンス法にてアミノ酸配列を解析した。その結果、3例ともRT領域に既報の核酸アナログ耐性変異は検出されなかった。1例においてTAF投与開始前よりrtT118Aの変異が検出され、投与開始後に投与開始前には検出されな

かったrtL220Iの変異が検出された。2例において投与開始前には検出されなかったrtQ215Hの変異が投与開始後に検出された。

[山田典栄、安田清美(清川病院)、加藤孝宣]

(4) IFN-λ3とIFN-αの同時投与による抗HBV効果の検討

培養細胞でのHBV複製モデルを用いてIFN-λ3によるHBウイルス関連蛋白に与える影響、およびIFN-λ3とIFN-αの同時投与による相加効果、相乗効果を検討した。HBV複製コンストラクト導入細胞にIFN-λ3を投与することにより、培養上清、細胞内ともにHBsAg、HBcrAgはIFN-λ3濃度依存的に低下した。同様の方法を用いてIFN-λ3、IFN-αの同時投与を行ったが、IFN-λ3単剤投与と比較しHBsAgの有意な低下は認めず、IFN-λ3、IFN-αの同時投与によるHBsAg低下の相加効果、相乗効果は確認されなかった。

[山田典栄、村田一素(国際医療福祉大学)、加藤孝宣]

(5) HBV感染がNK細胞により誘導されるアポトーシスの感受性に与える影響の解析

各種遺伝子型のHBV複製コンストラクトを用い、NK細胞と共培養することで、HBVの遺伝子型が免疫細胞により誘導されるアポトーシスに与える影響の評価を行った。HBV各種遺伝子型の複製プラスミドを導入したHepG2細胞とNK細胞とを共培養したところ、HBV遺伝子型A株が複製している細胞では遺伝子型B、C株の細胞と比較してアポトーシスの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と考えられた。

[椎名正明(新百合ヶ丘総合病院)、山田典栄、加藤孝宣]

(6) HBV Core領域I97L変異がHBV感染に与える影響についての検討

HBV Core領域I97L変異はHBe抗原陰性化後のB型慢性肝炎患者においてHBVDNAの低下とHBsAgの陰性化に関与することが報告されている。その機序を明らかにするためHBV感染系を用いて検討を行った。HBV遺伝子型C株のI97野生型とI97L変異型の1.38倍長のHBV複製コンストラクトを構築しHepG2細胞に導入し、得られたウイルスの感染力価について検討を行った。その結果、I97L変異を持つウイルス株では感染性の低下が認められた。そこで密度勾配超遠心法を用い分画されたフラクションからDNAを抽出し、サザンブロット法によりHBVゲノムの解析を行った。その結果、I97L変異型ではI97野生型と比較し、single-stranded DNA(SS)がrelaxed

circular DNA (RC)よりもより多く検出され、I97L 変異による感染性の低下は不完全二本鎖 DNA 合成が低下していることによるものと考えられた。

[山田典栄, 本多隆(名古屋大学), 加藤孝宣]

(7) HBV Core 領域 I97L 変異の cccDNA 合成に対する影響についての検討

HBV Core 領域 I97L 変異は HBe 抗原陰性化後の B 型慢性肝炎患者において HBV DNA の低下と HBsAg の陰性化に関与することが報告されている。その機序を明らかにするため I97L 変異が cccDNA 合成に与える影響について検討した。HBV Core 領域 I97 野生型と I97L 変異型のウイルスを HBV 感染感受性 HepG2-NTCP 細胞に感染させ 12 日後の cccDNA 量をリアルタイム PCR で測定した。その結果、I97L 変異型は I97 野生型と比較し有意に cccDNA 量が低かった。さらに I97 野生型と I97L 変異型の HBV 複製コンストラクトを HepG2 細胞に導入後、7 日後の cccDNA をサザンプロット法で検出したところ、I97L 変異型は I97 野生型と比較し cccDNA が低く検出された。

[山田典栄, 本多隆(名古屋大学), 加藤孝宣]

(8) HBV Core 領域 I97L 変異の Core 蛋白質結合 HBV DNA に対する影響についての検討

HBV Core 領域 I97 野生型と I97L 変異型の HBV 複製コンストラクトを HepG2 細胞に導入後、細胞内の Core 蛋白質結合 HBV DNA 量をリアルタイム PCR で測定した。その結果、I97L 変異型は I97 野生型と比較し有意に Core 蛋白質結合 HBV DNA 量が低かった。さらに Core 蛋白質結合 HBV DNA をサザンプロット法で検出したところ、I97 野生型では relaxed circular DNA (RC) が single-stranded DNA (SS) と比較し強く検出されたが、I97L 変異型では SS が RC より強く検出された。RC 量を反映すると考えられる HBe 領域、SS 量を反映すると考えられる HBx 領域を標的としたリアルタイム PCR を行い HBe/HBx 比を検討したところ I97L 変異型では I97 野生型より低く、サザンプロットの結果に一致した。

[山田典栄, 本多隆(名古屋大学), 加藤孝宣]

(9) L-HBs の 11aa 欠損 HBV の培養細胞および初代培養肝細胞への感染

培養細胞における感染効率の高い HBV を作製するために、HBV の遺伝子改変を行った。L-HBs に 11aa 欠損(d11)を持つ HBV プラスミドを導入した HepG2 細胞から得られた変異ウイルス(HBV-d11)は、HBV-wt プラスミド導入により得られたウイルス(HBV-wt)と比較して、HepG2-NTCP 細胞により効率的に感染することができた。また、HBV-d11 感

染細胞では、HBV-wt 感染後には観察できない HBV RNA の経時的増殖や、cccDNA の増殖も確認できた。さらに、HBV-d11 は初代培養肝細胞へも HBV-wt より効率良く感染できた。

[村山麻子, 大崎由喜, 山田典栄, 加藤孝宣]

(10) L-HBs の 11aa 欠損 HBV の解析

HBV-d11 は HBV-wt に比べて培養細胞に効率よく感染できる。d11 欠損は L-HBs, polymerase 蛋白質, および HBV ゲノムの長さを変えるため、どの領域が感染性増強に影響するのかを、ルシフェラーゼ遺伝子を持つレポーターウイルスである HBV_NL システムを用いて解析した。その結果、L-HBs が短くなることにより感染性増強が起こることが明らかとなった。L-HBs の 11aa 欠損の感染過程への影響を HDV の感染システムにより評価した。全長の L-HBs を持つ HDV (HDV-wt) と、11aa 欠損の L-HBs を持つ HDV (HDV-d11) を同量ずつ感染させると、HDV-d11 は HDV-wt よりも感染した細胞数が多く、L-HBs の 11aa を欠損させることにより HDV の感染効率を上昇させた。

[村山麻子, 大崎由喜, 加藤孝宣]

(11) 高感染性 HBV の性状解析

L-HBs の 11aa を欠損させた高感染性 HBV (HBV-d11) と HBV-wt を密度勾配遠心により分画し、性状を比較した。HBs 抗原, HBcr 抗原, HBV DNA のピークは HBV-d11 と HBV-wt では同じ密度に存在した。感染性のピークも HBV-d11 と HBV-wt では同じ密度に収束したが、感染価は HBV-d11 の方が約 10 倍高かった。HBs 抗原のピークフラクションの各 HBs 抗原の存在量をウエスタンブロッティングで比較したところ、L-HBs, M-HBs, S-HBs の存在比は HBV-d11 と HBV-wt で違いはなかった。S-HBs のなかで糖鎖付加された S-HBs の比率は変わらなかったが、L-HBs のなかで糖鎖付加された L-HBs の存在比が HBV-d11 では高くなっていた。

[村山麻子, 大崎由喜, 加藤孝宣]

(12) 高感染性 HBV 作製に必須な L-HBs の欠損領域の同定

L-HBs の 11aa 欠損における HBV 感染性増強の責任領域を同定するために、L-HBs の N 末端側から 2aa ずつ欠損させた変異ウイルス [d2 (2aa 欠損), d4 (4aa 欠損), d6 (6aa 欠損), d8 (8aa 欠損), d10 (10aa 欠損)] を作製し、HBV 感染性増強への効果を見た。その結果、d2 から d8 までは感染性増強は見られず、d10 では感染性の上昇は見られたが、11aa 欠損より効果は低く、L-HBs の N 末端の 11aa をすべて欠損させることにより HBV の感染性増強が最大と

なった。

[村山麻子, 大崎由喜, 加藤孝宣]

(13) HBs 抗原検出用体外診断薬の評価のための定量可能タグ付加 HBs 蛋白質の発現

HBs 抗原検出用体外診断薬の絶対評価のために定量可能な HBs 蛋白質の作製を試みた。HiBiT タグを付加した HBs 蛋白質に様々な長さのリンカー配列を挿入したものを培養細胞で発現させ、細胞内と培養液中の HBs 蛋白質の量を比較し、培養上清に効率良く分泌されるリンカーの配列と長さを同定した。そのリンカー配列を用いて HiBiT タグを付加した様々な遺伝子型の HBs 蛋白質を培養細胞で発現させ、細胞培養液に含まれる HBs 蛋白質の HBs 抗原量を測定し、同時に HiBiT 付加蛋白質を定量することにより HBs 抗原検出系の絶対評価を行った。その結果、測定に用いた検出系では、遺伝子型 C の HBs が遺伝子型 A および B より高値にでる傾向があった。

[村山麻子, 加藤孝宣, 百瀬暖佳, 浜口功 (血液・安全性研究部)]

(14) Identifying the host factors required for HBV-cccDNA formation

HBV-cccDNA remains in the liver and leads to a relapse after HBV replication targeting drugs are discontinued. We aim to analyze the mechanism by which HBV-cccDNA is formed, and try to develop drugs targeting this mechanism. By siRNA screening, we identified Polymerase Gamma as a possible host factor contributing to HBV-cccDNA formation. Silencing of PolG suppressed the de-novo synthesis of HBV-cccDNA without affecting HBV infection at the entry stage, suggesting it is directly acting on HBV-cccDNA. Interesting enough, we found that HBx protein induce the subcellular localization of polG from mitochondria to nucleus where it can participate in HBV-cccDNA biogenesis. Further analysis is undergoing to identify the mechanism by which polG support HBV-cccDNA formation.

[Hussein H Aly, Tawfeek Hussein, Takanobu Kato]

(15) Analyzing the role of MafF on the regulation of HBV replication.

Using HBV-reporter system that reflects the early stages of HBV infection from entry to translation of pgRNA, and druggable siRNA library, we identified MafF as a negative regulator of HBV infection. Further analysis identified its function as a suppressor of transcription from HBV-core promoter, leading to the consequent suppression of HBV-

replication. CHIP analysis showed that MafF directly interact with HBV-core promoter and competitively suppress HNF4A binding and the consequent HNF4A induction of transcription from HBV core promoter. Induction of MafF expression by IL-1b and TNF-a cytokines was also found in primary and hepatoma cells suggesting its participation in the anti-HBV response induced of these cytokines. This was confirmed by silencing MafF which suppressed IL-1b-mediated inhibition of transcription from HBV core promoter.

[Hussein H Aly, Marwa Khalil, Takanobu Kato]

(16) Screening for host factors affecting early stages of HBV-infection.

Similar to above, we are using HBV-reporter system that reflects the early stages of HBV infection from entry to translation of pgRNA, and a larger druggable siRNA library targeting 9000 human genes. Screening of this library is still undergoing to identify host factors that play an essential role in the early stages of HBV infection. Meanwhile, one of the identified factors so far is one of the Kinesin proteins (KIF4a). We found that KIF4a is a pro-HBV host factor that supports HBV infection by inducing NTCP translocation to the surface hepatocytes where it acts as a receptor for HBV virus and induce its internalization. Analysis in undergoing to identify other functions played by KIF4a that supports HBV infection.

[Hussein H Aly, Sameh Aly Gad, Takanobu Kato]

(17) B型肝炎ウイルス内在化機構の解析

HBV 内在化阻害化合物として同定した troglitazone の作用機序を解析することにより、未だ全貌が明らかでない HBV 内在化メカニズムを解析した。Troglitazone は HBV の感染受容体である NTCP の多量体形成を阻害することが明らかになった。また、NTCP の多量体化に重要な 2 つのタンパク質領域を同定するとともに、その領域からなるペプチド断片は NTCP 多量体化及び HBV 内在化を阻害した。これは NTCP 多量体化が HBV 内在化を引き起こす 1 つの要因であることを示唆するとともに、この過程が新たな創薬標的になり得ることを示した。

[深野顕人, 九十田千子, 大嶋美月, 渡士幸一, 村松正道]

(18) 上皮成長因子受容体による B 型肝炎ウイルス内在化制御機構の解明

B 型肝炎ウイルス(HBV)は細胞膜上で感染受容体 NTCP と結合した後に上皮成長因子受容体(EGFR)を介して細胞内への侵入を果たすことを明らかにした。HBV は EGFR 依存的なエンドサイトーシス経路を細胞内侵入に利用しており、

EGFR 阻害剤であるゲフィチニブを細胞に処理すると EGFR エンドサイトーシスが阻害され、結果として HBV 感染も減少した。これら結果は HBV の細胞内侵入に必要な宿主因子の制御機構を明らかにしたとともに、EGFR が新たな創薬標的になり得ることを示唆する。

[岩本将士、佐宗若奈、西岡華実、大橋啓史、梁明秀(横浜市立大学)、朴三用(横浜市立大学)、村松正道、俣野哲朗(エイズ研究センター)、岩見真吾(九州大学)、渡士幸一]

(19) HBV RT の伸長反応を阻害する化合物の同定

in vitro high throughput system を用いて 1,100 種類以上の非核酸系化合物で構成される化合物ライブラリーより、HBV RT の伸長反応を阻害する化合物を同定した。これをリード化合物として、その構造類似体を HepG2.2.15.7 細胞での HBV 複製アッセイおよび HepG2-hNTCP-C4 細胞と初代ヒト肝細胞での HBV 感染実験で評価したところ、HBV DNA レベルを用量依存的に低下させる PDM2 を同定した。この化合物はエンテカビル/ラミブジン耐性 HBV の複製も野生型 HBV と同様に阻害し、また現在使用されている核酸アナログとの併用により抗 HBV 効果を上昇させることを明らかにした。

[中嶋章悟、脇田隆宇、豊田哲也(福祉村病院長寿医学研究所)、渡士幸一]

(20) HBV 感染阻害コレステロール誘導体の同定

コレステロール誘導体は HBV の感染阻害効果を持つことが明らかになったため、更なる誘導体展開により HBV 感染阻害活性の強いコレステロール誘導体を同定した。興味深いことに得られたコレステロール誘導体は HBV の侵入を阻害する新規作用機序を持つことが明らかとなった。近年コレステロール誘導体は骨粗鬆症の治療薬候補として研究開発されていることから、新規抗 HBV 薬シーズとなることが期待される。

[大嶋美月、深野顕人、岩本将士、倉持幸司(東京理科大)、渡士幸一]

(21) NTCP-EGFR 相互作用を標的とした HBV 感染阻害戦略

最近明らかになった HBV 感染を制御する上皮増殖因子受容体(EGFR)と NTCP との相互作用を標的とし、この相互作用を阻害するペプチド(デコイペプチド)を用いて HBV 感染阻害を試みた。デコイペプチドは NTCP の EGFR への結合を競合的に阻害することにより、HBV の細胞内への侵入を阻害した。このペプチドは、核酸アナログ耐性株を含む様々な HBV 株の感染を阻害した。これらの結果から NTCP-EGFR 相互作用が HBV 感染阻害の新規標的となることが示された。

[塩野谷果歩、岩本将士、村松正道、倉持幸司(東京理科大)、渡士幸一]

(22) インターフェロンを介したB型肝炎ウイルスに対する免疫応答機構の解析

宿主の RNA 編集である ADAR1 が、IFN α により発現が誘導され、p53 を介して HBV-RNA を減少させることを示した。ADAR1 は miRNA-122 の発現を正に調節し、miRNA-122 が HBV-RNA を負に制御することを見出した。IFN α による抗ウイルス作用の分子制御機構を解明した。

[劉光炎(瀋陽医科大学)、若江亨祥、松田麻未、杉山隆一、村松正道]

(23)自然免疫宿主因子APOBECの遺伝的多型性による抗HBV作用への違い

遺伝子改変宿主因子 APOBEC3 は HBV 複製を抑制することが知られている。我々は遺伝子多型による APOBEC3 の抗 HBV 作用の違いについて検討し、(i) APOBEC3C の 188I 変異体が、188S よりも強い抗ウイルス活性を持つことを見出した。(ii) APOBEC3H の 7 種類の haplotype、及びその haplotype II の 4 種類のスプライズバリエントを比較し、haplotype 及びバリエント間で活性が異なる事を示した。以上の結果は、HBV に対する感染抵抗性が APOBEC の遺伝子多型によって規定されている可能性を示唆した。

[Arun Kanagaraj(金沢大学)、Que Lusheng、Li Yingfang 若江亨祥、村松正道、喜多村晃一]

(24) B型肝炎ワクチン力価試験法の検討: *in vitro* 試験

B社のB型肝炎ワクチン・シリンジ剤について、加温変性による劣化ワクチンを用いた *in vivo* と *in vitro* 試験のバリデーションを行った。加温変性はHBs抗原含量を *in vitro* 試験でモニタリングしながら 37°C、60°C、70°Cの順に温度を上げていき、最終的に 70°C48時間後、抗原含量の低下が確認できたところで停止した。劣化ワクチンの力価を現行の国家検定に準じた *in vivo* 試験と、*in-house* kit による *in vitro* 試験で確認した。4°C保存ワクチンに比べて劣化ワクチンの力価は *in vivo*、*in vitro* の順に、-39%、-33%と同様の傾向を示した。*in-house* キットによる *in vitro* 試験は *in vivo* 試験の代替試験として活用できると考えられる。[清原知子、鈴木亮介、李天成、杉山隆一、佐藤知子、松田麻未、村松正道]

(25) HBV preS1 内 NTCP 結合ドメインの中和エピトープ解析

HBV の NTCP への結合に重要な preS1(2-47aa)の中和エ

ピトープの解析を行う目的で、preS1(2-47aa)領域に対するマウスモノクローナル抗体の作製・解析を試みた。preS1(2-47aa)発現プラスミドを免疫した BALB/c マウスから preS1(2-47aa)特異的な記憶 B 細胞を単離し、抗体遺伝子をクローニングすることにより複数のモノクローナル抗体を作製した。モノクローナル抗体の HBV 感染中和評価及びエピトープ解析の結果 preS1(2-47aa)の N 末端側と C 末端側の 2 つの領域が中和エピトープであることを見出した。

[矢藤慶悟、小野寺大志（免疫部）、森山彩野（免疫部）、松田麻未、藤本陽（富士レビオ）、森石恆司（山梨大）、高橋宜聖（免疫部）、田村浩二（東京理科大）、加藤孝宣、村松正道、鈴木亮介]

(26) HBV preS2 領域に対する抗体の中和活性評価

HBV preS2 領域に対する抗体が感染中和活性を有しているかを明らかにするために、市販の抗 preS2 モノクローナル抗体の中和活性を、HBV レポーターウイルスを用いて評価した。その結果、複数のモノクローナル抗体で顕著な中和活性が認められた。次に免疫で誘導した抗 preS2 血清が中和活性を有しているかを調べるために preS2 発現プラスミドを BALB/c マウスに免疫した。それからマウス血清のウイルス感染中和評価を行なったところ中和活性が認められ、preS2 領域の免疫によって中和抗体が誘導されることを見出した。

[矢藤慶悟、藤本陽（北里大）、森石恆司（山梨大）、田村浩二（東京理科大）、加藤孝宣、村松正道、鈴木亮介]

3. C 型肝炎ウイルス (HCV) に関する研究

(1) HIV 合併 C 型急性肝炎症例の HCV 遺伝子型および薬剤耐性変異の解析

近年、都内の男性間性交渉者において HIV 合併 C 型急性肝炎が散見されており、これらの症例の中に本邦においては稀な遺伝子型 2C の HCV 株が検出された。これら HCV 遺伝子型 2C 症例を集積し、配列解析および直接作用型抗ウイルス薬 (DAA) に対する薬剤耐性変異の解析を行った。都内 3 施設より 12 例の遺伝子型 2C 確定または疑いの HIV 合併 C 型肝炎症例を収集し解析した。HCV Core 領域の塩基配列を決定し系統解析を行ったところ、遺伝子型は全て 2C でありこれらの株はクラスターを形成した。さらに NS3、NS5A 領域の遺伝子増幅が可能であった症例のアミノ酸配列を確認したところ既報の DAA 薬剤耐性変異は検出されなかった。

[山田典栄、畠山修司（自治医科大学）、鈴木 智彦（大久保病院）、岡本耕（東京大学）、瀧永博之（国立国際医

療研究センター）、村松崇（東京医科大学）、加藤孝宣]

(2) HCV JFH-1 株における Sofosbuvir 耐性変異の検討

HCV の治療薬の一つである sofosbuvir (SOF) は HCV の NS5B 蛋白質をターゲットとする薬剤であり、HCV の遺伝子型に関わらず効果があるとされている。しかし遺伝子型 3a の中には SOF に耐性を示す株が存在することが知られており、培養細胞で再現可能な耐性変異も複数同定されている。これらの SOF 耐性変異が他の遺伝子型においても SOF に耐性を示すか検討するために、遺伝子型 3a 株で報告された SOF 耐性変異を遺伝子型 2a の JFH-1 株に導入し、培養細胞内での HCV の増殖と SOF に対する耐性について解析した。その結果、それらの変異はいずれも単独では JFH-1 株の増殖能や SOF に対する感受性には影響しなかった。

[村山麻子、竹原徹郎（大阪大学）、加藤孝宣]

(3) HCV JFH-1/S282T 変異株における Sofosbuvir 耐性変異の検討

HCV NS5B 領域の S282T 変異は強力な SOF 耐性変異であるが HCV の増殖能を低下させることが知られている。培養細胞で遺伝子型 2a の JFH-1 株に S282T 変異を導入すると増殖能が著しく低下し、野生型 JFH-1 株よりも SOF に耐性を示した。S282T 変異に加えて HCV 遺伝子型 3a 株で報告された SOF 耐性変異を JFH-1 株に追加すると、増殖能が上昇し、SOF 耐性もさらに強くなった。これらの変異は遺伝子型 2a の HCV 株では単独では SOF 耐性を示さなかったが、他の SOF 耐性変異と組み合わせるとさらに SOF 耐性が増強されることが明らかとなった。

[村山麻子、竹原徹郎（大阪大学）、加藤孝宣]

(4) 肝細胞内脂質蓄積による HCV 伝播への影響の解析
芳香族炭化水素受容体 (AhR) の阻害により感染性 HCV 粒子産生効率を低下させる化合物としてフルタミドを同定している。フルタミドの誘導體展開により低用量で強力に AhR 活性を阻害し、抗 HCV 活性を示す化合物を同定した。AhR 阻害により脂肪滴産生を低下させる濃度でこれを処理したところ HCV 感染の広がりが低下した。これらの結果は、感染細胞内の脂肪滴蓄積が HCV 伝播経路に影響を与える可能性を示唆している。

[大橋啓史、西岡華実、深澤征義（細胞化学部）、渡士幸一]

(5) 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している。

[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 (ミノファーゲン製薬)、市野瀬志津子 (東京医科歯科大学)、脇田隆字、村松正道]

(6) 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。SVR 症例の肝組織の電顕観察を進め、SVR 後 F 値が改善しない症例で優位に発がんを認めた。また、SVR 後も長期にわたりオルガネラ異常が観察され、「post-SVR syndrome」というような病態を見出した。

[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 (ミノファーゲン製薬)、相崎英樹、脇田隆字、村松正道]

(7) 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 PSURF4 を見出した。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いるものと考えられた。

[Lingbao Kong (江西農業大学)、山越智 (真菌部)、相崎英樹、脇田隆字、村松正道]

(8) 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 形成に関わっている可能性が示された。

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

(9) 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。

[ガオ ユーティン、後藤耕司 (東大感染症内科)、山越智 (真菌部)、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、村松正道]

(10) 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。

[フランク プイーバサゴイチ、相崎英樹、深澤征義、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、村松正道]

(11) 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 RNA が複製活性を維持したまま、細胞間をエクソゾームを介して移動することを見いだした。

[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、村松正道]

(12) 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。県・市 (A 県、東京都 A 市、神奈川県 A 市、愛知県 A 市、静岡県・香川県・福井県の市) をモデル地区として、陽性者をフォローアップした。

[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)、脇田隆宇、村松正道]

(13) 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。

[相崎英樹、田中純子 (広島大)、脇田隆宇、村松正道]

(14) 本邦における急性C型肝炎のサーベイランス

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、遺伝子を調べたところ、同じウイルスが蔓延している可能性が示唆された。

[相崎英樹、砂川富正 (感染症疫学センター)、田中純子 (広島大)、脇田隆宇、村松正道]

(15) 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、2016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、脇田隆宇、村松正道]

(16) HCV感染をモニターするための細胞の樹立

cre-loxPシステムでHCV感染により赤から緑の蛍光を変化するHuh751-RG細胞を11クローン樹立し、感染による蛍光の変化を観察した。HCV-cre感染後、緑蛍光細胞の集団は増加するが、すべての細胞が緑蛍光に変化するわけではなく15日後に約40%の細胞が緑蛍光を表した。そして培養を継続すると緑細胞は減少した。感染33日後の細胞からソーティングにより感染細胞(緑)の集団を分取した。更にDAA処理により感染細胞からウイルスを排除した。HCV未感染細胞(赤)、HCV感染細胞(緑)、HCV排除細胞(緑)を樹立した。今後はこの3種の細胞

の比較解析を行う。

[渡邊則幸、鈴木貴也、相崎英樹、村松正道、脇田隆宇]

(17) HCV 1b型の複製系の構築

遺伝子型1bのHCVであるKT9株の遺伝子配列を用いてSubgenomic replicon (SGR) を作製してコロニーフォーメーションアッセイを行った。薬剤選択培養後に得られたコロニーについて細胞内で複製しているKT9 SGR配列を決定した。複数のコロニーから同定できたアミノ酸変異について、この変異を含む11種類のSGRを作製して再度コロニーフォーメーションアッセイを行った。その結果、9種類についてコロニーフォーメーション効率が上昇した。これらのアミノ酸変異はRNA複製を上昇させる変異と考えられる。今後はこれらの変異を持つ全長KT9を作製してHCV産生を解析する。

[渡邊則幸、鈴木貴也、相崎英樹、村松正道、脇田隆宇]

(18) E2モノクローナル抗体のエピトープ解析

E2-ferritin融合タンパク質を抗原として樹立した4種類のハイブリドーマの中で2種の抗体に注目して解析を進めた。これらは抗原に用いた2a型とは異なる遺伝子型(1-4型)のE2タンパク質とも反応し、変性したE2タンパク質とも結合することから、立体構造ではなくアミノ酸配列を認識することが明らかになり、1つはウイルス感染を阻害した。共にCD81結合領域を認識するが、感染中和抗体はN末端側のCD81結合領域、感染中和しない抗体はC末端側のCD81結合領域を認識した。

[吉田南風、渡邊則幸、鈴木貴也、相崎英樹、村松正道、脇田隆宇]

(19) C型肝炎ウイルスの生活環に関わるイオンチャネルの同定とその解析

イオンチャネルsiRNAライブラリーを用いたスクリーニングを行い、HCV生活環に関わる4種のイオンチャネル(KCNG1、KCNE5、KCNJ11、TMC7)を同定した。これらの遺伝子についてCrispr-Cas9システムでKO細胞の構築を試みた。KO細胞が樹立できた3種のKO細胞について、HCV感染実験を行ったところ3種すべてについてHCV産生が低下した。HCV生活環へのイオンチャネルの関与が示された。今後はこれらの分子の作用機序に注目して解析を進める。

[佐藤李香、渡邊則幸、相崎英樹、村松正道、脇田隆宇]

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

血液製剤に混入する可能性がある患者由来HCVの不活

条件を明らかにするため、患者由来 HCV を培養細胞で増殖させようと試みている。HCV JFH1 株以外の株が増殖できる FU97 細胞に、HCV の増殖に重要であると報告された宿主因子 Sec14L2 を発現する培養細胞を作製し、HCV 患者由来血漿を感染させた。しかし、現在のところこの細胞を用いて患者由来 HCV の増殖は見られていない。

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

4. E 型肝炎ウイルス(HEV)に関する研究

(1) Kestrel HEV のウイルス様粒子の作製およびその応用

Kestrel HEV は Kestrel から検出された新型 HEV であり、Species HEV-C に分類されている。Kestrel HEV の抗原性解析のため、本研究では Kestrel HEV の構造蛋白を組換えバキュロウイルス発現システムで発現し、ウイルス様粒子の作成を試みた。N 末端 111aa を欠失した Kestrel HEV 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、培養上清から Kestrel HEV-LPs を得られた。現在、Kestrel HEV-LPs をウサギに免疫して誘導された抗体を用いて他の遺伝子型の HEV と比較してウイルスの抗原性を同定している。

[白慧敏、李天成、片岡紀代(感染病理部)、網 康至、須崎百合子(動物管理室)、脇田隆字、村松正道]

(2) ウサギにおける HEV の感染性及び病原性の研究

Rabbit HEV はウサギから分離された G3HEV に属する新しい E 型肝炎ウイルスである。その病原性はまだはっきりしていない。本研究では rabbit HEV をウサギに接種し、その病原性を検討した。細胞培養から獲得した Rabbit HEV を六羽のウサギに静脈経由で接種し、経時的に採血、採便して、血中の anti-HEV 抗体、血中及び便中の HEV RNA を検査した結果、ウイルスの増殖が確認された。また、接種後、ALT の上昇が見られた。長期観察の結果は Rabbit HEV がウサギに肝炎を引き起こし、一部のウサギでは持続感染を呈することが明らかになった。現在持続感染を引き起こすウイルスの遺伝子変化を観察している。

[張文静、李天成、Doan Hai Yen：高橋雅春、岡本宏明(自治医科大学)、網康至、須崎百合子(動物管理室)、村松正道]

(3) G7 HEV に対するアカゲザルの感受性およびワクチンの可能性の検討

アカゲザルにおける G7 HEV を静脈から接種し、ウイル

スの感染を確認した。この結果は G7 HEV に対するアカゲザルの感受性が示唆された。また、ウイルス様粒子 G1 HEV-LPs と G3 HEV-LPs をアカゲザルに筋肉接種したことにより高抗体価の anti-HEV IgG が誘導された。さらに HEV-LPs を接種したサルに G7 HEV を接種しても HEV の感染が認められなかった。この結果は異なる遺伝子型の VLPs は G7HEV に対するワクチン効果があることが明らかになった。

[Yingqiu Guo, Fengmei Yang, Zhanlong He, Qihan Li (中国昆明中国医学科学院)、武田直和(大阪大学)、村松正道、李天成]

(4) 低分子化合物ライブラリーを用いた HEV 複製阻害物質の探索

HEV レプリコン RNA を導入した細胞に低分子化合物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、ウイルス複製を阻害する低分子化合物のスクリーニングを行った結果、ウイルス複製阻害活性を持つ低分子化合物が 16 種類見つかった。さらにこの低分子化合物について HEV 感染細胞を用い評価したところ、6 種類の低分子化合物で HEV の増殖が抑制された。これら低分子化合物の作用機序から HEV の複製機構や病原性発現機構の解析を行っている。

[杉山隆一、石井孝司(品質保証・管理部)、鈴木亮介、脇田隆字、村松正道]

(5) キナーゼ siRNA ライブラリーを用いた HEV 複製に関するキナーゼの探索

HEV レプリコン RNA を導入した細胞にキナーゼ siRNA ライブラリーを導入し、レプリコンのレポーター遺伝子の発現を指標として、ウイルス複製を抑制、または促進するキナーゼの探索を行った。その結果、ウイルス複製に関するキナーゼが複数見つかったことから、これらキナーゼのウイルス複製に関わる作用機序を検討している。

[杉山隆一、石井孝司(品質保証・管理部)、鈴木亮介、脇田隆字、村松正道]

(6) 石川県で捕獲されたイノシシの HEV 感染調査

2017-2019 年に石川県で捕獲されたイノシシ 86 頭の血清の HEV IgG を測定した。22 頭 (26%) が陽性で、性別での陽性率はオスの 31% に対し、メスは 17% であった。また体重 20kg 未満の幼獣で 30%、成獣の 24% が陽性であり、抗体価の高い個体は幼獣に多く認められた。

[李天成、杉山隆一、小宮智義(北陸大学)、鈴木亮介]

(7)E型肝炎の国内発生動向調査

国内におけるE型肝炎の流行状況について、各地方衛生研究所、保健所と共同で分子疫学的解析を行った。2019年のE型肝炎報告数490件のうち、90検体の遺伝子情報を集積し、解析を行った。その内訳は遺伝子型1: 2.2%、遺伝子型3: 93.3%、遺伝子型4: 4.4%と、昨年と同様の傾向であった。国内での流行は主に遺伝子型3で、得られた遺伝子配列から各症例の多くは広域的な散発例と考えられたが、一部で相同性の高いクラスターが認められた。

[鈴木亮介、杉山隆一、李天成、清原知子、村松正道]

その他のウイルスに関する研究

1. 新型コロナウイルス (SARS-CoV-2) に関する研究

(1) SARS-CoV-2増殖を抑制する既存薬のスクリーニング
SARS-CoV-2感染増殖培養系を用いて、既存薬からSARS-CoV-2増殖を抑制する化合物のスクリーニングをおこない、いくつかの候補を得た。

[大橋啓史、佐宗若奈、塩野谷果歩、渡士幸一]

2. カニクイザルから Simian Sapelovirus の分離

カンボジアから輸入したカニクイザルの10%便乳剤を濾過除菌後、PLC/PRF/5細胞に接種した。接種後細胞にCPEが観察され、さらにその培養上を接種したPLC/PRF/5細胞に同じCPEが観察された。培養上清を塩化セシウム密度勾配遠心法で精製し、直径32nmのウイルス粒子が観察された。NGS解析によりウイルスの全長配列が得られ、BLAST解析により新しい Simian Sapelovirus であることが明らかになった。

[張文静、片岡紀代 (感染病理部)、Yen Hai Doan、網康至 (動物管理室)、村松正道、李天成]

3. Porcine Sapelovirus 被感受性の細胞の樹立および reovirus の分離

Crisper/Cas9を用いてPLC/PRF/5のある遺伝子を取り除き、Porcine Sapelovirus に対する被感受性の細胞N1380を樹立した。台湾由来豚の10%便乳剤を濾過除菌後、N1380細胞に接種した。接種後細胞にCPEが観察され、さらにその培養上を接種したPLC/PRF/5細胞に同じCPEがみられた。培養上清を塩化セシウム密度勾配遠心法で精製し、直径~90nmのウイルス粒子が観察された。NGS解

析によりウイルスの全長配列が得られ、BLAST解析によりCPEを起こしたウイルスはreovirusであることが明らかになった。

[張文静、片岡紀代 (感染病理部)、吳芳姿 (台湾 CDC) Yen Hai Doan、武田直和 (大阪大学) 村松正道、李天成]

4. タイにおけるフラビウイルスの血清学的調査

タイ国4都市の健常人血清154検体について、一回感染性フラビウイルスを使用して、6つのフラビウイルス (DENV-1、DENV-2、DENV-3、DENV-4、JEV、およびZIKV) それぞれの中和抗体価の測定を行った。全てのウイルスは、年齢と共に中和抗体の保有率が上昇していた。どの地域の検体も4つのDENVに対する中和抗体を有する検体の割合が多く、30歳以上ではほぼ全検体が中和抗体を有していた。一方でJEVとZIKVに対する抗体保有率には地域差が認められた。

[松田麻未、山中敦史 (阪大微研)、塩田達雄 (阪大微研) 鈴木亮介]

5. レポーターを持つポリオーマウイルス中和試験系の確立

JCポリオーマウイルス (JCV) は進行性多巣性白質脳症 (PML) の原因因子として知られているが、一方で日本人成人の約7割以上がJCV抗体を持っていることから、多くの人が不顕性感染すると考えられている。ELISAによるJCV抗体価の測定がPML発症のリスク評価に利用されているが、中和抗体の意義や他のポリオーマウイルスとの交差性は明らかでない。そこでレポーターを持つ1回感染性粒子を利用した、JCVを含む複数のポリオーマウイルス中和試験系を確立した。ヒト血清を用いて感度や特異性についてのELISAとの相違を検証している。

[松田麻未、李天成、中西章 (近畿大学)、村松正道、鈴木哲朗 (浜松医大)、鈴木亮介]

発表業績一覧

I. 誌上発表

1. 欧文発表

1) Aoki H, Sunaga F, Ochiai H, Masuda T, Ito M, Akegami M, Naoi Y, Sano K, Katayama Y, Omatsu T, Oba M, Sakaguchi S, Furuya T, Ouchi Y, Shirai J, Mizutani T, Oka T, Nagai M. Phylogenetic Analysis of Novel Posaviruses Detected in Feces of Japanese Pigs With Posaviruses and Posa-Like Viruses of Vertebrates and Invertebrates. Arch

Viol. 164(8):2147-2151. 2019.

- 2) Apostol LN, Shimizu H, Suzuki A, Umami RN, Jiao MMA, Tandoc A 3rd, Saito M, Lupisan S, Oshitani H. Molecular characterization of enterovirus-A71 in children with acute flaccid paralysis in the Philippines. BMC Infect Dis 19: 370, May 2019
- 3) Arita M and Iwai-Itamochi M. Evaluation of antigenic differences between wild and Sabin vaccine strains of poliovirus using the pseudovirus neutralization test. Scientific reports, 9:11970, 2019
- 4) Arita M, and Bigay J. Poliovirus evolution toward independence from the phosphatidylinositol-4 kinase III β /oxysterol-binding protein family I pathway. ACS Infectious Diseases, 5: 962-973, 2019
- 5) Arita M. Essential domains of phosphatidylinositol-4 kinase III β required for enterovirus replication, Microbiology and Immunology, Microbiology and Immunology, 63: 285-288, 2019
- 6) Balingit JC, Phu Ly MH, Matsuda M, Suzuki R, Hasebe F, Morita K, Moi ML A Simple and High-Throughput ELISA-Based Neutralization Assay for the Determination of Anti-Flavivirus Neutralizing Antibodies. Vaccines (Basel). 2020 Jun 10;8(2):E297.
- 7) Dainichi T, Nakano Y, Wakae K, Otsuka M, Muramatsu M, Kabashima K. APOBEC3 regulates keratinocyte differentiation and expression of Notch3. Exp Dermatol. 2019 Nov;28(11):1341-1347.
- 8) Doi A, Hikita H, Kai Y, Tahata Y, Saito Y, Nakabori T, Yamada R, Kodama T, Sakamori R, Murayama A, Nitta S, Asahina Y, Suemizu H, Tatsumi T, Kato T, Takehara T. Combinations of two drugs among NS3/4A inhibitors, NS5B inhibitors and non-selective antiviral agents are effective for hepatitis C virus with NS5A-P32 deletion in humanized-liver mice. J Gastroenterol. May;54(5):449-458.(2019).
- 9) Fujii Y, Doan YH, Suzuki Y, Nakagomi T, Nakagomi O, Katayama K. Study of Complete Genome Sequences of Rotavirus A Epidemics and Evolution in Japan in 2012-2014. Front Microbiol. 10:38, 2019
- 10) Fujii Y, Doan YH, Wahyuni RM, Lusida MI, Utsumi T, Shoji I, Katayama K. Improvement of Rotavirus Genotyping Method by Using the Semi-Nested Multiplex-PCR With New Primer Set. Front Microbiol. 2019, 10:647.
- 11) Fujii Y, Kashima Y, Sunaga F, Aoki H, Imai R, Sano K, Katayama Y, Omatsu T, Oba M, Furuya T, Tsuzuku S, Ouchi Y, Shirai J, Mizutani T, Oka T, Nagai M. Complete Genome Sequencing and Genetic Analysis of a Japanese Porcine Torovirus Strain Detected in Swine Feces. Arch Virol. 165(2):471-477. 2020.
- 12) Fujii Y, Oda M, Somura Y, Shinkai T: Molecular characteristics of novel mono-reassortant G9P[8] rotavirus A strains possessing the NSP4 gene of the E2 genotype detected in Tokyo, Japan. Jpn J Infect Dis. 2020, 73(1):26-35.
- 13) Fujimi TJ, Mezaki Y, Masaki T, Tajima A, Nakamura M, Yoshikawa A, Murai N, Aizawa M, Kojima S, Matsumoto Y, Aizaki H, Matsuura T. Investigation of the effects of urea cycle amino acids on the expression of ALB and CEBPB in the human hepatocellular carcinoma cell line FLC-4. Hum Cell. 2020 Jul;33(3):590-598. doi: 10.1007/s13577-020-00383-1. Epub 2020 May 30. PMID: 32474770
- 14) Funakoshi Y, Ito K, Morino S, Kinoshita K, Morikawa Y, Kono T, Doan HY, Shimizu H, Hanaoka N, Konagaya M, Fujimoto T, Suzuki A, Chiba T, Akiba T, Tomaru Y, Watanabe K, Shimizu N. Enterovirus D68 respiratory infection in a children's hospital in Japan in 2015, Pediatr Int 61:768-776, Aug 2019
- 15) Furutani Y, Toguchi M, Shiozaki-Sato Y, Qin XY, Ebisui E, Higuchi S, Sudoh M, Suzuki H, Takahashi N, Wataishi K, Wakita T, Kakeya H, Kojima S. An interferon-like small chemical compound CDM-3008 suppresses hepatitis B virus through induction of interferon-stimulated genes. PLoS One 14(6): e0216139 (2019)
- 16) Guo H, Hu J, Kramvis A, Lampertico P, Janssen HLA, Levrero M, Li W, Liang TJ, Lim SG, Lu F, Penicaud MC, Tavis JE, Thimme R, Arbutnot P, Boonstra PA, Chang KM, Chen PJ, Glebe D, Guidotti LG, Fellay J, Ferrari C, Jansen L, Lau DTY, Lok AS, Maini MK, Mason W, Matthews G, Paraskevis D, Petersen J, Rehermann B, Shin EC, Thompson

- A, van Bömmel F, Wang FS, Watashi K, Yang HC, Yuan Z, Yuen MF, Block T, Miller V, Protzer U, Bréchet C, Locarnini S, Peters MG, Schinazi RF, Zoulim F. A global scientific strategy to cure hepatitis B. *Lancet Gastroenterol Hepatol* 4(7): 545-558 (2019)
- 17) Iwamoto M, Saso W, Sugiyama R, Ishii K, Ohki M, Nagamori S, Suzuki R, Aizaki H, Ryo A, Yun JH, Park SY, Ohtani N, Muramatsu M, Iwami S, Tanaka Y, Sureau C, Wakita T, Watashi K. Epidermal growth factor receptor is a host entry cofactor triggering hepatitis B virus internalization. *Proc Natl Acad Sci USA* 116(17): 8487-8492 (2019)
- 18) Kamata M, Takeuchi T, Hayashi E, Nishioka K, Oshima M, Iwamoto M, Nishiuchi K, Kamo S, Tomoshige S, Watashi K, Kamisuki S, Ohri H, Sugawara F, Kuramochi K. Synthesis of nucleotide analogues, EFdA, EdA and EdAP, and the effect of EdAP on hepatitis B virus replication. *Biosci Biotechnol Biochem* 84(2): 217-227 (2020)
- 19) Kanagaraj A, Sakamoto N, Que L, Li Y, Mohiuddin M, Koura M, Wakae K, Kurachi M, Muramatsu M, Kitamura K. Different antiviral activities of natural APOBEC3C, APOBEC3G, and APOBEC3H variants against hepatitis B virus. *Biochem Biophys Res Commun.*;518(1):26-31 (2019).
- 20) Kaneko M, Do LP, Doan YH, Nakagomi T, Gauchan P, Agbemabiese CA, Dang AD, Nakagomi O. Porcine-like G3P[6] and G4P[6] rotavirus A strains detected from children with diarrhoea in Vietnam. *Arch Virol* 163:2261-2263, 2018
- 21) Kano M, Kondo S, Wakisaka N, Wakae K, Aga M, Moriyama-Kita M, Ishikawa K, Ueno T, Nakanishi Y, Hatano M, Endo K, Sugimoto H, Kitamura K, Muramatsu M, Yoshizaki T. Expression of estrogen receptor alpha is associated with pathogenesis and prognosis of human papillomavirus-positive oropharyngeal cancer. *Int J Cancer*. 145(6):1547-1557, 2019
- 22) Kato T, Murayama A, Wakita T. Establishment of Replication-Competent HCV Strain with Minimum Modifications. *Methods Mol Biol*. 1911:73-83.(2019).
- 23) Katsuta R, Sunaga F, Oi T, Doan YH, Tsuzuku S, Suzuki Y, Sano K, Katayama Y, Omatsu T, Oba M, Furuya T, Ouchi Y, Shirai J, Mizutani T, Oka T, Nagai M. First identification of Sapoviruses in wild boar. *Virus Res*. 271:197680. 2019.
- 24) Khoris IM, Chowdhury AD, Li TC, Suzuki T, Park EY. Advancement of capture immunoassay for real-time monitoring of hepatitis E virus-infected monkey *Anal Chim Acta*. 2020 May 8;1110:64-71. doi: 10.1016/j.aca.2020.02.020. Epub 2020 Feb 12.
- 25) Kitagawa K, Kuniya T, Nakaoka S, Asai Y, Watashi K, Iwami S. Mathematical analysis of a transformed ODE from a PDE multiscale model of hepatitis C virus infection. *Bull Math Biol* 81(5): 1427-1441 (2019)
- 26) Koga M, Lim LA, Ogishi M, Satoh H, Kikuchi T, Adachi E, Sugiyama R, Kiyohara T, Suzuki R, Muramatsu M, Koibuchi T, Tsutsumi T, Yotsuyanagi H. Comparison of clinical features of hepatitis A in people living with HIV between pandemic in 1999-2000 and that in 2017-2018 in a metropolitan area of Japan. *Jpn J Infect Dis*. 2020 Mar 24;73(2):89-95.
- 27) Kong L, Aoyagi H, Yang Z, Ouyang T, Matsuda M, Fujimoto A, Watashi K, Suzuki R, Arita M, Yamagoe S, Dohmae N, Suzuki T, Suzuki T, Muramatsu M, Wakita T, Aizaki H. Surfeit 4 contributes to the replication of hepatitis C virus using double membrane vesicles. *J Virol*. 2020 6;94(2).
- 28) Liu G, Ma X, Wang Z, Wakae K, Yuan Y, He Z, Yoshiyama H, Iizasa H, Zhang H, Matsuda M, Sugiyama R, Yuan Z, Muramatsu M, Li L. Adenosine deaminase acting on RNA-1 (ADAR1) inhibits hepatitis B virus (HBV) replication by enhancing microRNA-122 processing. *J Biol Chem*. 20;294(38):14043-14054 (2019).
- 29) Murayama A, Momose H, Yamada N, Hoshi Y, Muramatsu M, Wakita T, Ishimaru K, Hamaguchi I, Kato T. Evaluation of in vitro screening and diagnostic kits for hepatitis B virus infection. *J Clin Virol*. Aug;117:37-42. (2019).
- 30) Nio Y, Sasai M, Akahori Y, Okamura H, Hasegawa H, Oshima M, Watashi K, Wakita T, Ryo A, Tanaka Y, Hijikata M. Bardoxolone methyl as a novel potent antiviral agent

- against hepatitis B and C viruses in human hepatocyte cell culture systems. *Antiviral Res* 169: 104537 (2019)
- 31) Nitta S, Asahina Y, Kato T, Tsuchiya J, Inoue-Shinomiya E, Sato A, Tsunoda T, Miyoshi M, Kawai-Kitahata F, Murakawa M, Itsui Y, Nakagawa M, Azuma S, Kakinuma S, Hikita H, Takehara T, Watanabe M. Impact of novel NS5A resistance-associated substitutions of hepatitis C virus detected in treatment-experienced patients. *Sci Rep*. Apr 5;9(1):5722. (2019).
- 32) Okitsu S, Khamrin P, Takanashi S, Thongprachum A, Hoque SA, Takeuchi H, Khan MA, Hasan SMT, Iwata T, Shimizu H, Jimba M, Hayakawa S, Maneekarn N, Ushijima H. Molecular detection of enteric viruses in the stool samples of children without diarrhea in Bangladesh. *Infect Genet Evol* 77: 104055. Jan 2020
- 33) Okumura A, Mori H, Fee Chong P, Kira R, Torisu H, Yasumoto S, Shimizu H, Fujimoto T, Tanaka-Taya K. Acute Flaccid Myelitis Collaborative Study I. Serial MRI findings of acute flaccid myelitis during an outbreak of enterovirus D68 infection in Japan. *Brain Dev* 41: 443-451, May 2019
- 34) Ozawa H, Yoshida H, Usuku S. Environmental Surveillance Can Dynamically Track Ecological Changes in Enteroviruses. *Appl. Environ. Microbiol.* 85(24);e01604-19, 2019
- 35) Pham NTK, Thongprachum A, Shimizu Y, Trinh QD, Okitsu S, Komine-Aizawa S, Shimizu H, Hayakawa S, Ushijima H. Diversity of human parechovirus in infants and children with acute gastroenteritis in Japan during 2014-2016. *Infect Genet Evo* 75: 104001. Nov 2019
- 36) Saito K, Fukasawa M, Shirasago Y, Suzuki R, Osada N, Yamaji T, Wakita T, Konishi E, Hanada K. Comparative characterization of flavivirus production in two cell lines: Human hepatoma-derived Huh7.5.1-8 and African green monkey kidney-derived Vero. *PLoS One*. 2020 Apr 24;15(4):e0232274.
- 37) Sakai Y, Okumura H, Iwao T, Watahi K, Ito K, Matsunaga T. Development of an in vitro cholestatic drug-induced liver injury evaluation system using HepG2-hNTCP-C4 cells with sandwich configuration. *Toxicol In Vitro* 61: 104619 (2019)4950515253545556)
- 38) Shiina M, Yamada N, Sugiyama R, Murayama A, Aly HH, Muramatsu M, Wakita T, Imawari M, Kato T. Hepatitis B Virus Genotype-dependent Vulnerability of Infected Cells to Immune Reaction in the Early Phase of Infection. *Front Microbiol*. Oct 18;10:2427. (2019).
- 39) Shiota T, Li TC, Nishimura Y, Yoshizaki S, Sugiyama R, Shimojima M, Saijo M, Shimizu H, Suzuki R, Wakita T, Muramatsu M, Ishii K. Integrin alpha3 is involved in non-enveloped hepatitis E virus infection. *Virology*. 2019, 536, 119-124
- 40) Toyama M, Sakakibara N, Takeda M, Okamoto M, Watahi K, Wakita T, Sugiyama M, Mizokami M, Ikeda M, Baba M. Pyrimidotriazine derivatives as selective inhibitors of HBV capsid assembly. *Virus Res* 271: 197677 (2019)
- 41) Uotani T, Murakami K, Uchida T, Tanaka S, Nagashima H, Zeng XL, Akada J, Estes MK, Graham DY, Yamaoka Y. Changes of tight junction and interleukin-8 expression using a human gastroid monolayer model of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter* (2019) Jun;24(3):e12583
- 42) Ushioda W, Kotani O, Kawachi K, Iwata-Yoshikawa N, Suzuki T, Hasegawa H, Shimizu H, Takahashi K, Nagata N. Neuropathology in Neonatal Mice After Experimental Coxsackievirus B2 Infection Using a Prototype Strain, Ohio-1. *J Neuropathol Exp Neurol* 79: 209-225, Feb 2020
- 43) Utsumi T, Athiyah A, Wahyuni R, Dinana Z, Yamani L, Soetjipto S, Sudarmo S, Ranuh R, Darma A, Juniastuti J, Raharjo D, Matsui C, Deng L, Abe T, Doan YH, Fujii Y, Shimizu H, Katayama K, Lusida MI, Shoji I. Molecular epidemiology and clinical features of rotavirus infection among pediatric patients in East Java, Indonesia during 2015-2018: dynamic changes in rotavirus genotypes from equine-like G3 to typical human G1/G3. *Front Microbiol* 10: 490, May 2019
- 44) Watanabe N, Suzuki T, Date T, Hussan HA, Hmwe SS, Aizaki H, Sugiyama M, Mizokami M, Delaney Iv W, Cheng G, Muramatsu M, Wakita T. Establishment of infectious genotype 4 cell culture-derived hepatitis C virus. *J Gen Virol*. 2020 Feb;101(2):188-197. doi: 10.1099/jgv.0.001378. Epub

2019 Dec 20. PMID: 31859613

45) Yamada N, Murayama A, Shiina M, Aly HH, Iwamoto M, Tsukuda S, Watashi K, Tanaka T, Moriishi K, Nishitsuji H, Sugiyama M, Mizokami M, Shimotohno K, Muramatsu M, Murata K, Kato T. Anti-Viral Effects of Interferon-λ3 on Hepatitis B Virus Infection in Cell Culture. *Hepatol Res*. Mar;50(3):283-291. (2020).

46) Yamane D, Feng H, Rivera-Serrano EE, Selitsky SR, Hirai-Yuki A, Das A, McKnight KL, Misumi I, Hensley L, Lovell W, González-López O, Suzuki R, Matsuda M, Nakanishi H, Ohto-Nakanishi T, Hishiki T, Wauthier E, Oikawa T, Morita K, Reid LM, Sethupathy P, Kohara M, Whitmire JK, Lemon SM. Basal expression of interferon regulatory factor 1 drives intrinsic hepatocyte resistance to multiple RNA viruses. *Nature Microbiology*. s41564-019-0425-6. (2019)

47) Zhang W, Kataoka M, Doan HY, Ami Y, Suzaki Y, Takeda N, Muramatsu M, Li TC. Characterization of a Novel Simian Sapelovirus Isolated from a Cynomolgus Monkey using PLC/PRF/5 Cells. *Sci Rep*. 2019 Dec 27;9(1):20221. doi: 10.1038/s41598-019-56725-z.

48) Zhang W, Yoshizaki S, Ami Y, Suzaki Y, Takeda N, Muramatsu M, Li TC. High Prevalence of Hepatitis E Virus Infection in Imported Cynomolgus Monkeys in Japan. *Jpn J Infect Dis*. 2019 Jul 31. doi: 10.7883/yoken. JJID.2019.72.429-431..

49) Zhou X, Bai H, Kataoka M, Ito M, Muramatsu M, Suzuki T, Li TC. Characterization of the self-assembly of New Jersey polyomavirus VP1 into virus-like particles and the virus seroprevalence in Japan. *Sci Rep*. 2019 Sep 11;9(1):13085. doi: 10.1038/s41598-019-49541-y.

2. 和文発表

1) 岩本 将土, 渡士 幸一 B型肝炎ウイルス受容体としての胆汁酸トランスポーターNTCP, 医学の歩み, 271 (1) : 92-96 (2019).

2) 清原知子, 鈴木亮介, 村松正道: A型肝炎ワクチン. 病原微生物検出情報 (IASR), 2019, Vol.40, No.9, p11

3) 佐宗若奈, 九十田千子, 渡士幸一 B型肝炎ウイルス受容体と創薬. 臨床とウイルス. 47(1) (2019)

4) 佐宗若奈, 九十田千子, 渡士幸一 HBVレセプターNTCPを標的とした創薬. 肝胆膵. 78(6):985-991. (2019)

5) 崎山 弘, 城 青衣, 梅本 哲, 清水博之, 大石和徳. 全国調査による定期予防接種の累積接種率調査: 2017年・2018年調査. 外来小児科 22: 462-470, 2019

6) 清水博之. 世界ポリオ根絶計画の現状と病原体サーベイランス. 病原微生物検出情報 41: 21-23, 2020

7) 清水博之. 「エンテロウイルス」の項を担当、大曲貴夫監修. 【今日の疾患辞典】 デジタル版 Current Decision Support (CDS), 佐藤寿彦編, 2019

8) 清水博之. 「ポリオ」の項を担当、西條政幸編、グローバル時代のウイルス感染症、204-208、日本医事新報社, 2019

9) 清水博之. 【話題の疾患と治療】手足口病～過去10年間で最大規模の流行. 感染症免疫 50 : 46-47, 2020

10) 清水博之. エンテロウイルス D68 感染症と中枢神経疾患. 臨床とウイルス 47, 210-217, 2019

11) 清水博之. 手足口病の流行周期と原因エンテロウイルス. チャイルドヘルス, 2019

12) 清水博之. エンテロウイルス D68 感染症. 小児科診療「小児感染症のいまを読み解く」82,769-774, 2019

13) 清水博之. 感染症法施行規則の一部改正 急性弛緩性麻痺 (AFP; ポリオを除く) が五類感染症に追加. ファルマシア 55, 341, 2019

14) 清水博之. ポリオウイルス基幹施設におけるバイオリスク管理と施設認証. JBSA Newsletter 8, 2019

15) 杉山隆一、清原知子、鈴木亮介、石井孝司、村松正道、砂川富正. 2018 年の A 型肝炎流行状況について. 病原微生物検出情報 (IASR)、2019; Vol.40、No.9、p4-5

16) 鈴木亮介: A 型肝炎ウイルス、E 型肝炎ウイルス 小児科診療 特集 小児の食中毒 2019 Vol.82, p1

17) 永田典代、長谷川秀樹、清水博之、斎藤博之. エンテロウイルス感染による急性弛緩性麻痺の病理. 病原微生物検出情報 41: 25-27, 2020

18) 藤本嗣人、花岡 希、多屋馨子、清水博之. 急性弛緩性麻痺(AFP)を認める症例からのEV-D68、EV-A71の検出方法を含めた非ポリオエンテロウイルス検査. 病原微生物検出情報 41: 28-29, 2020

19) 藤本嗣人、花岡 希、小長谷昌未、高橋健一郎、多屋馨子、清水博之. エンテロウイルス脳炎と検体採取について. 病原微生物検出情報 40: 107-108, 2019

20) 山田典栄、平石哲也、小林稔、池田裕喜、渡邊綱正、奥瀬千晃、今井康晴、四柳宏、加藤孝宣、鈴木通博、安田清美. 首都圏における B 型肝炎の変遷: Genotype A の急増から 10 年を経て. 肝臓 60(5): 139-146.(2019).

21) 相崎英樹、脇田隆宇、坂本亭宇、C 型肝炎からの発癌機序、肝癌診療マニュアル第4版、日本肝臓学会、医学書院、7-8, 2019

II. 学 会 発 表

1. 国際学会

1) Akahori Y, Sasai M, Okamura H, Oshima M, Watashi K, Wakita T, Tanaka Y, Nio Y, Hijikata M. Bardoxolon methyl suppresses the HBV replication by enhancement of HBV RNA degradation. 2019 International Meeting on Molecular Biology of Hepatitis B Viruses. Melbourne (Australia). October. 2019.

2) Aoyagi H, Iijima H, Kikuchi M, Koyama M, Matsuda M, Watashi K, Suzuki R, Masaki T, Shimada N, Kato K, Tsubota A, Wake K, Wakita T, Aizaki H. Abnormal Hepatocellular Organelles Patients with Sustained Virological Response

(SVR). 26th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Seoul, South Korea, 5-8, October, 2019.

3) Aoyagi H, Iijima H, Koyama M, Wakae K, Watashi K, Suzuki R, Saito T, Shimada N, Kato K, Tsubota A, Mimata A, Sakamaki Y, Ichinose S, Wake K, Muramatsu M, Wakita T, Aizaki H. Ultrastructure of hepatocytes in chronic hepatitis B patients. 2019 Molecular Biology of Hepatitis B Viruses. Malborne, Australia, 1-5, October, 2019.

4) Arita M and Bigay J. Poliovirus evolution towards independence from the phosphatidylinositol-4 kinase III β /oxysterol-binding protein family I pathway, 60th International Conference on the Bioscience of Lipids, Tokyo, Japan, 19th Jun, 2019

5) Fukano K, Passioura T, Shimura S, Saso W, Morishita R, Ogasawara Y, Tanaka Y, Mizokami M, Sureau C, Suga H, Wakita T, Watashi K. Macrocyclic peptides inhibited HBV entry without interfering with NTCP transporter activity. 7th JAPAN-TAIWAN-KOREA HBV Research Symposium 2019. 2019/4/5-6. Tokyo (Japan).

6) Fukano K, Tsukuda S, Oshima M, Suzuki R, Aizaki H, Ohki M, Park SY, Muramatsu M, Wakita T, Sureau C, Ogasawara Y, Watashi K. Interference with NTCP oligomerization impairs the HBV internalization. 7th JAPAN-TAIWAN-KOREA HBV Research Symposium 2019. 2019/4/5-6. Tokyo (Japan).

7) Fukano K, Tsukuda S, Oshima M, Ohki M, Park SY, Wakae K, Aizaki H, Wakita T, Muramatsu M, Watashi K. NTCP oligomerization involved in hepatitis B virus internalization. 2019 International HBV Meeting. 2019/10/1-5. Melbourne (Australia).

8) Hotta H, Aoki-Utsubo C, Chen M, Nishimoto S, Lin Deng L, Miyayama Y, Hijikata M, Shindo, K, Noda T, Kohara M, Tsukuda S, Watashi K, Wakita T. Future analysis of possible antiviral activity of CM-II-sPLA2 against HBV, HCV and HDV. 2019 International Meeting on Molecular Biology of Hepatitis B Viruses. Melbourne (Australia). October. 2019.

9) Ibrahim MK, Gad SA, Watashi K, Li Y, Sugiyama M, Ito M, Murayama A, Suzuki T, Kato T, Shimotohno K, Muramatsu M, Wakita T, Aly HH. MafF is a key player of IL-1 β -induced suppression of transcription from HBV-core promoter, and the

resulting suppression of viral replication. 2019 International Meeting, molecular Biology of Hepatitis B virus. October 1-5, Melbourne, Australia.

10) Ito K, Okumura A, Takeuchi SJ, Sakamoto K, Watashi K, Wakita T, Yoneda M. FXR/TGR5 dual agonist inhibits hepatitis B virus infection in vitro and in vivo. 2019 International Meeting on Molecular Biology of Hepatitis B Viruses. Melbourne (Australia). October. 2019.

11) Iwamoto M, Saso W, Ohki M, Suzuki R, Aizaki H, Ryo A, Park SY, Muramatsu M, Iwami S, Tanaka Y, Sureau C, Wakita T, Watashi K. Epidermal growth factor receptor as a novel host entry cofactor that triggers hepatitis B virus internalization. 2019 International Meeting on Molecular Biology of Hepatitis B Viruses. Melbourne (Australia). October. 2019.

12) Kitajima M, Ohama M, Murakami K, Sano D, Okabe S. Determining Norovirus Infectivity Based on Specific Detection of Negative Strand Viral RNA. 20th Symposium of the IWA-Health Related Water Microbiology. September 15-20, 2019, Vienna, Austria

13) Kitamura K, Kanagaraj A, Sakamoto N, Que L, Mohiuddin M, Koura M, Wakae K, Kurachi M, Muramatsu M. Difference of hepatitis B virus restriction activity between natural variants in APOBEC3C, 3G, and 3H. 7th Japan-Taiwan-Korea HBV Research Symposium 5-7 April, 2019, Tokyo, Japan. ポスタ一発表

14) Murakami K, Tenge VR, Karandikar U, Lin SC, Ramani S, Ayyar BV, Atmar RL, Estes KM. Bile acids and ceramide are critical to allow GII.3 human norovirus entry into human intestinal enteroids. Calicivirus 2019 Conference. October 13-17 2019, Sydney, Australia

15) Murata T, Iwahori S, Yanagi Y, Kimura H, Watashi K, Wakita T, Nishitsuji H, Shimotohno K. m6A modification of HBV RNA and its roles in replication. 2019 International Meeting on Molecular Biology of Hepatitis B Viruses. Melbourne (Australia). October. 2019.

16) Murayama A, Hikita H, Yamada N, Muramatsu M, Takehara T, Kato T. Assessment of P32 Deletion in Hepatitis C Virus NS5A to Viral Replication and Susceptibility to

Antiviral Reagents. 26th International Symposium on Hepatitis C virus and Related viruses. October 5-8, 2019, Seoul, South Korea.

17) Murayama A, Yamada N, Muramatsu M, Kato T. Efficient infection system with cell-culture generated hepatitis B virus produced by transient transfection. 2019 International Meeting, molecular Biology of Hepatitis B virus. October 1-5, Melbourne, Australia.

18) Murayama A, Yamada N, Muramatsu M, Kato T. Production of Highly Infectious Hepatitis B Virus in Cell Culture. AASLD The Liver Meeting 2019, November 8-12, Boston, USA.

19) Nakajima S, Watashi K, Fukano K, Tsukuda S, Aizaki H, Muramatsu M, Wakita T, Toyoda T. High throughput screening of hepatitis B virus reverse transcriptase inhibitors. 2019 International Meeting on Molecular Biology of Hepatitis B Viruses. Melbourne (Australia). October. 2019.

20) Nishioka K, Ohashi H, Suzuki R, Aizaki H, Muramatsu M, Wakita T, Watashi K. Identification of aryl hydrocarbon receptor ligands as inhibitor of lipid accumulation and hepatitis C virus production. 26th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. 2019.10.5-8 Seoul (Korea).

21) Ohashi H, Suzuki R, Aizaki H, Fukasawa M, Kuramochi K, Muramatsu M, Wakita T, Watashi K. The Inhibition of AhR-Dependent Lipid Accumulation Pathway Impacted the Host Permissiveness to HCV Production and Lead to Elimination. 26th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. 2019.10.5-8 Seoul (Korea).

22) Oikawa K, Ishiyama R, Yoshida K, Takai-Todaka R, Murakami K, Nakanishi A, Katayama K. Functional Analysis of Norovirus Minor Capsid Protein VP2. Calicivirus 2019 Conference. October 13-17 2019, Sydney, Australia

23) Oka T, Doan YH, Omatsu T, Mizutani T, Sunaga F, Nagai M. Complete genome analysis of sapoviruses from Sus scrofa. 7th International Calicivirus Conference, 2019.10.13-17 Sydney, Australia

24) Oka T, Kuo TY, Doan YH, Wu FT. Sapoviruses from

acute gastroenteritis outbreaks and hospitalized children in Taiwan. 7th International Calicivirus Conference, 2019.10.13-17 Sydney, Australia

25) Oka T, Saito H, Kobayashi T, Takahashi T, Shimoike T, Kataoka M, Wang Q, Saif LJ, Noda M, Takagi H. Cell culture trials for human sapoviruses. 7th International Calicivirus Conference, 2019.10.13-17 Sydney, Australia

26) Oshima M, Iwamoto M, Wakae K, Aizaki H, Kuramochi K, Muramatsu M, Sureau C, Wakita T, Watashi K. Receptor tyrosine kinase inhibitors as novel anti-hepatitis B virus entry inhibitors. 2019 International Meeting on Molecular Biology of Hepatitis B Viruses. Melbourne (Australia). October. 2019.

27) Saso W, Iwamoto M, Ryo A, Ohki M, Park SY, Suzuki R, Aizaki H, Muramatsu M, Sureau C, Wakita T, Matano T, Watashi K. Evaluation of NTCP decoy peptide as an HBV internalization inhibitor through dissociation of NTCP-EGFR complex. HBV International Meeting. Melbourne, Australia. (2019).

28) Shimizu H. A Turning Point in Global Polio Eradication - Residual risk and vaccine strategies- The annual conference of pathogenic microbiology and biosafety. Shantou, Guangdong, China, 16 October, 2019

29) Suzuki R, Matsuda M, Shimoike T, Watashi K, Aizaki H, Kato T, Suzuki T, Muramatsu M, Wakita T. Activation of protein kinase R by hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase. Keystone symposia: Positive-Strand RNA Viruses, Killarney, Ireland. 2019.6.9-13.

30) Takeuchi F, Ikeda S, Tsukamoto Y, Iwasawa Y, Qihao C, Otakaki Y, Ouda R, Yao W, Narita R, Hijikata M, Watashi K, Wakita T, Takeuchi K, Chayama K, Kogure A, Kato H, Fujita H. A novel lentiviral screening for inhibitor of episomal DNA identified dicumarol as a inhibitor of HBV replication. 2019 International Meeting on Molecular Biology of Hepatitis B Viruses. Melbourne (Australia). October. 2019.

31) Tsukuda S, Kurusu T, Kojima S, Muramatsu M, Iwami S, Watashi K. Analysis of HBV dynamics during entry process and cccDNA formation based on virological experiments combined with mathematical models. 2019 International Meeting on Molecular Biology of Hepatitis B Viruses.

Melbourne (Australia). October. 2019.

32) Wakae K, Kondo S, Hai PT, Que L, Li Y, Muramatsu M, Yoshizaki T. Epstein-Barr virus LMP1 alters expression profiles of APOBEC3s, and hypermutates mitochondrial DNA in nasopharyngeal cells. DNA Tumor Virus meeting 2019. 2019/7/9-14

33) Watashi K. Analysis of Hepatitis B virus cell entry and its application to drug development. 江西農業大学セミナー. 江西農業大学. 2019.6.18

34) Yato K, Onodera T, Matsuda M, Fujimoto A, Watashi K, Aizaki H, Kato T, Moriishi K, Tamura K, Takahashi Y, Wakita T, Muramatsu M, Suzuki R. Characterization of monoclonal antibodies against HBV preS1 region from antigen-specific memory B cells. 2019 International HBV Meeting. 2019.10.1-5 Melbourne (Australia). (ポスター)

35) Zheng X, Wakae K, Watanabe N, Hussein H A, Watashi K, Suzuki R, Aizaki H, Wakita T, Song S, Muramatsu M. Screening of anti-hepatitis C virus natural compounds extracted from crude drugs using an in vitro visualization system. HCV2019. Korea. Oct 5-8, 2019.

2. 国内学会

1) 青柳東代, 飯島尋子, 菊池みなみ, 小山舞子, 松田麻未, 渡士幸一, 鈴木亮介, 政木隆博, 齋藤剛, 島田紀朋, 加藤慶三, 榎本大, 林和彦, 坪田昭人, 三又絢子, 酒巻有里子, 市野瀬志津子, 村松正道, 和氣健二郎, 脇田隆字, 相崎英樹. HCV に対する抗ウイルス治療後、SVR 後の肝細胞の超微細構造の変化. 第 67 回日本ウイルス学会学術集会. 東京. 2019 年 10 月 29 日～31 日.

2) 青柳東代, 飯島尋子, 松田麻未, 若江亨祥, 渡士幸一, 鈴木亮介, 政木隆博, 坪田昭人, 和氣健二郎, 脇田隆字, 相崎英樹. HCV に対する抗ウイルス治療後、SVR 後の肝細胞の超微細構造の変化. 第 26 回肝細胞研究会. 横浜. 2019 年 5 月 23～24 日.

3) 青柳東代, 飯島尋子, 松田麻未, 渡士幸一, 鈴木亮介, 政木隆博, 坪田昭人, 島田紀朋, 加藤慶三, 林和彦, 榎本大, 三又絢子, 酒巻有里子, 市野瀬志津子, 村

松正道, 和氣健二郎, 脇田隆宇, 相崎英樹. HCV に対する抗ウイルス治療後、SVR 後の肝細胞の超微細構造の変化. 第 51 回日本臨床分子形態学会総会・学術集会. 横浜. 2019 年 9 月 20~21 日.

4) Ibrahim MK, Gad SA, Watashi K, Li Y, Sugiyama M, Ito M, Murayama A, Suzuki T, Kato T, Shimotohno K, Muramatsu M, Wakita T, Aly HH. The IL-1 β induced (MafF) is an important regulator of HBV core promoter activity. The 67th Annual Meeting of the Japanese Society for Virology. Tokyo, October 29 – 31.

5) Ishiyama R, Takai-Todaka R, Oikawa K, Nakanishi A, Murakami K, Song C, Murata K, Katayama K. Study of components of norovirus infectious particle for interior structure analysis. 第 67 回日本ウイルス学会学術集会, 2019 年 10 月 29 日-31 日, 東京

6) 岩波 翔也, 北川 耕咲, 大橋 啓史, 浅井 雄介, 渡士 幸一, 岩見 真吾. 感染動態の定量的解析による HCV JFH-1 株と Jc1 株の比較. 第 67 回日本ウイルス学会学術集会. 2019. 10. 29-31. 東京.

7) 今川稔文、伊藤昌彦、高林秀次、田中一雄、記野秀人、松田麻未、鈴木亮介、宮本和慶、小杉伊三夫、高崎智彦、鈴木 哲朗. 妊娠コモンマーマセットにおけるジカウイルス感染の病原性. 第 67 回日本ウイルス学会、船堀 2019 年 10 月 29-31 日

8) Oikawa K, Yoshida K, Ishiyama R, Takai-Todaka R, Murakami K, Nakanishi A, Katayama K. Functional Analysis of Norovirus Minor Capsid Protein VP2. 第 67 回日本ウイルス学会学術集会, 2019 年 10 月 29 日-31 日, 東京

9) 大橋啓史, 鈴木亮介, 相崎英樹, 深澤 征義, 倉持幸司, 村松正道, 脇田隆宇, 渡士幸一. C 型肝炎ウイルス感染および薬剤耐性出現における aryl hydrocarbon receptor 依存的脂肪滴産生機構の役割. 第 67 回日本ウイルス学会学術集会. 2019.10.29-31. 東京. 口頭発表

10) 大嶋美月, 岩本将士, 若江亨祥, 相崎英樹, 倉持幸司, 村松正道, 脇田隆宇, 渡士幸一. Characterization of inhibitors for receptor tyrosine kinase as a novel anti-hepatitis B virus entry inhibitors. 第 67 回日本ウイルス学会学術集会. 2019.10.29-31. 東京.

11) 大嶋美月, 深野頭人, 岩本将士, 若江亨祥, 相崎英樹, 村松正道, 脇田隆宇, 倉持幸司, 渡士幸一. 酸化コレステロールによる HBV 内在化阻害とその機構の解析. 第 16 回ウイルス学キャンプ in 湯河原. 静岡. (2019).

12) 勝田りさ子, 須永藤子, 大井, 片山幸枝, 白井淳資, 水谷哲也, 岡智一郎, 長井誠. イノシシから世界初となるサポウイルスの検出、日本家畜衛生学会第 91 回大会、東京、2019.12.20.

13) 神山長慶, Benjawan Saechue, Astri Dewayani, 飛弾野真也、佐知望美、小坂聡太郎、有木晋平、曾我泰裕、後藤美月、鈴木亮介、小林隆志. ジカウイルスアフリカ株はアジア株に比べて宿主細胞への侵入能が高く、EAE を増悪させる. 第 42 回日本分子生物学会、福岡 2019 年 12 月 2-4 日

14) 喜多村晃一, Lusheng Que, 島津美幸, 小浦美樹, 村松正道. B 型肝炎ウイルス cccDNA の形成に関する DNA 修復因子 FEN1. 日本生化学会北陸支部第 37 回大会, 福井, 2019

15) 清原知子, 砂川富正, 鈴木亮介, 杉山隆一, 村松正道. A 型肝炎と海外渡航. 第 23 回日本渡航医学会学術集会, 東京 2019.7.14-15..

16) 清原知子. A 型肝炎ウイルス動向調査：流行状況の解析. 2019 年度赤十字血液シンポジウム第 31 回北海道輸血シンポジウム, 北海道 2019.7.19.

17) 木村美幸, 松田麻未, 鈴木亮介, 福原崇介, 松浦善治, 谷英樹. 一回感染性デングウイルス粒子システムを利用したデングウイルスの感染を阻害する低分子化合物のスクリーニング. 第 67 回日本ウイルス学会、船堀 2019 年 10 月 29-31 日

18) 木田浩司, 吉田弘, 望月靖, 岡山県における環境水サーベイランスによるノロウイルス GII 遺伝子型の流行把握 第 78 回日本公衆衛生学会 令和元年 10 月 23-25 日、高知市 (ポスター)

19) Khoris IM, Li TC, Suzuki T, Park EY. The detection of the HEV in the monkey feces using AuNPs@Ag nanozyme in capture immunoassay. The 6th International Symposium toward the Future of Advanced Researches in Shizuoka

University (ISFAR-SU2020)、浜松 2020年3月5日

20) 佐宗若奈, 岩本将士, 村松正道, 俣野哲朗, 渡士幸二, B型肝炎ウイルス侵入を制御する G タンパク質受容体の同定と作用機序解析. 第16回ウイルス学キャンプ in 湯河原. 静岡. (2019) Poster.

21) 佐宗若奈, 岩本将士, 西岡華実, 大橋 啓史, 杉山隆二, Ryo A, Ohki M, Park SY, 鈴木亮介, 相崎英樹, 村松正道, 脇田隆字, 俣野哲朗, 渡士幸一, Endocytosis machinery for epidermal growth factor receptor mediates the hepatitis B virus internalization. The Japanese Society for Virology. Tokyo. (2019) Oral.

22) 斎藤博之, 柴田ちひろ, 佐藤寛子, 清水博之, ガンマグロブリン製剤のエンテロウイルス D68 型に対する中和能. 第60回 臨床ウイルス学会. 2019年5月25日、ウインクあいち、名古屋

23) 斎藤博之, 秋野和華子, 佐藤寛子, 藤谷陽子, 柴田ちひろ, 田中貴子, 佐藤了悦, 佐藤進, 清水博之. 乳飲みマウスを用いたガンマグロブリン製剤のエンテロウイルス D68 型に対する中和能の検討 (ポスター). 第67回日本ウイルス学会学術集会, 2019年、東京

24) 齊藤恭子, 深澤征義, 白砂圭崇, 鈴木亮介, 山地俊之, 脇田隆字, 小西英二, 花田賢太郎. ヒト肝癌由来 Huh7. 5. 1-8細胞とアフリカミドリザル腎由来 Vero細胞におけるフラビウイルス産生能の比較解析. 第92回日本生化学会大会、横浜、2019年9月18日~20日

25) 齊藤恭子, 深澤征義, 鈴木亮介, 高崎智彦, 花田賢太郎, 黄熱ウイルスサブゲノミックレプリコンシステムの構築とレプリコン保持細胞の性状解析. 第67回日本ウイルス学会、船堀 2019年10月29-31日

26) 下池貴志. The 3' end of the negative-sense of Norovirus genome RNA is important to the genome RNA synthesis (ノロウイルスゲノムのマイナス鎖 RNA の 3' 末端の配列はゲノム RNA の合成に重要である)、第42回日本分子生物学会年会、福岡、2019年12月3-6日

27) 清水博之. エンテロウイルス D68 感染症と中枢神経疾患. 第60回 臨床ウイルス学会. シンポジウム1 「未知・既知のウイルス感染症の病態を解く」、2019年5月25日、ウインクあいち、名古屋

28) 清水博之. 急性弛緩性麻痺症例から検出されるエンテロウイルスとその検査. 衛生微生物技術協議会 第40回研究会 シンポジウム II 2019年7月11日熊本市市民会館

29) 白土東子. ノロウイルス感染と検出技術, 第12回メデイカル・イノベーション・ワークショップ, 2019年12月, 埼玉県

30) 杉山隆一, 砂川富正, 清原知子, 鈴木亮介, 石井孝司, 村松正道. 2018年に日本で発生した A型肝炎アウトブレイクの疫学的及び遺伝学的分析. 第67回日本ウイルス学会、船堀 2019年10月29-31日

31) 染谷友美, 村山-加藤美幸, 桂一茂, 坂井直樹, 伊原健太郎, 村山和隆, 白水美香子, 染谷雄一 「ノロウイルス抗原性決定領域と抗体の複合体構造解析」第92回日本生化学会、横浜、2019年9月18-20日

32) Tomomi Kimura-Someya, Miyuki Kato-Murayama, Kazushige Katsura, Naoki Sakai, Kentaro Ihara, Kazutaka Murayama, Mikako Shirouzu, Yuichi Someya “Structural analysis of norovirus antigenic domain/antibody complex” RIKEN BDR retreat 2019、淡路、兵庫、2019年10月7-9日

33) Tomomi Kimura-Someya, Yuichi Someya, Miyuki Kato-Murayama, Kazushige Katsura, Kazutaka Murayama, Mikako Shirouzu “Structural basis for the binding of histo-blood group antigens to the norovirus capsid protein” CBI 学会 2019年大会、東京、2019年10月22-24日

34) 高橋雅輝, 吉田弘 岩手県における環境水サーベイランスで分離されたエンテロウイルスの動向 第78回日本公衆衛生学会 令和元年10月23-25日、高知市 (ポスター)

35) 高木弘隆, 岡智一郎, 斎藤博之, 小林孝行, 野田衛 Requirement of bile acids on human sapovirus growth in cultured cells (ヒトサポウイルス増殖における胆汁酸要求性) 第67回日本ウイルス学会学術集会、東京、2019.10.29-31

36) 竹村謙信, Ankan Dutta Chowdhury、李天成、鈴木哲朗, 朴龍洙, グラフエン量子ドット-金ナノ粒子-ポ

リアニリンナノワイヤ複合体を用いた電気化学的バイオセンサーによるカニクイザル糞便からのHEVの検出、第71回日本生物工学会大会、岡山 2019年9月16~18日

37) 竹内 文彦, 池田 宗太郎, 塚本 雄太, 應田 涼太, 土方 誠, 渡土 幸一, 脇田 隆字, 茶山 一彰, 木檜 周, 加藤 博己, 藤田 尚志. 変異型レンチウイルスを用いたHBV エピソーム DNA 阻害剤の開発変異型レンチウイルスを用いたHBV エピソーム DNA 阻害剤の開発. 第67回日本ウイルス学会学術集会. 2019.10.29-31. 東京.

38) 竹内(柴田) 潤子, 深野 顕人, 岩本 将士, 九十田 千子, 鈴木 亮介, 相崎 英樹, 村松 正道, 脇田 隆字, Sureau Camille, 渡土 幸一. B型肝炎ウイルス(HBV)関連ヘパドナウイルスの適応進化メカニズムの解明. 第67回日本ウイルス学会学術集会. 2019.10.29-31. 東京.

39) 張文静、須崎百合子、網康至、Suljid Jilintai、高橋雅春、村松正道、岡本宏明、李天成. Production of Rabbit Hepatitis E Virus by a Reverse Genetic System. 第67回日本ウイルス学会、船堀 2019年10月29-31日

40) 張文静、片岡紀代、呉芳姿、Yen Hai Doan、村松正道、李天成. Sapelovirus 非感受性 N1380 細胞を用いた2型ほ乳類レオウイルスの分離第162回日本獣医学会。筑波2019.9.

41) 九十田 千子, 久留主 達也, 小嶋 聡一, 村松 正道, 岩見 真吾, 渡土 幸一. 培養感染系および数理モデルを用いたB型肝炎ウイルスの細胞内動態の解析. 第67回日本ウイルス学会学術集会. 2019.10.29-31. 東京.

42) Zheng X, Yan Y, Wakae K, Watanabe N, Aly HH, Watashi K, Suzuki R, Aizaki H, Wakita T, Song S, Muramatsu M, 生薬から単離した天然化合物の抗HCV作用の検討. 第67回日本ウイルス学会学術集会. 2019年10月29日-2019年10月31日.

43) 永田典代、宮崎誠、齋藤博之、柴田ちひろ、ドウアンイエンハイ、荒尾雄二郎、岩田(吉河)奈織子、清水博之、長谷川秀樹. マウスモデルにおけるエンテロウイルスD68の神経病原性. 第67回日本ウイルス学会学術集会, 2019年10月29日-31日、東京

44) 中嶋章悟, 渡土幸一, 加藤孝宣, 脇田隆字, 豊田哲

也. エンテカビル耐性B型肝炎ウイルス逆転写酵素の反応速度論的解析. 第42回日本分子生物学会年会. 福岡. 12月. 2019

45) 中嶋章悟, 渡土幸一, 深野顕人, 九十田千子, 相崎英樹, 村松正道, 脇田隆字, 豊田哲也. B型肝炎ウイルス(HBV)逆転写伸長反応系を利用したHBV複製阻害剤の同定. 第67回日本ウイルス学会学術集会. 2019.10.29-31. 東京.

46) 西岡華実, 大橋 啓史, 鈴木亮介, 相崎英樹, 村松正道, 脇田隆字, 渡土幸一, C型肝炎ウイルスおよび肝細胞内脂質蓄積を制御する芳香族炭化水素受容体リガンドの同定およびその特性解析. 第67回日本ウイルス学会学術集会. 2019.10.29-31. 東京.

47) Nguyen AT, Hoa-Tran TN, Dao ATH, Kataoka C, Shimizu H. A 10-year study on circulation and genetic characteristics of coxsackievirus A6 and A16 in northern Vietnam, 2008-2017. (ポスター) 第67回日本ウイルス学会学術集会, 2019年10月29日-31日、東京

48) 濱島洋介, 吉田弘 和歌山県の環境水サーベイランスと感染症発生動向調査で検出された腸管系ウイルス第78回日本公衆衛生学会 令和元年10月23-25日、高知市 (ポスター)

49) 濱崎光宏、松岡由美子、近藤芳樹、吉田弘、調恒明 「検査プロセスの改善(KAIZEN)に向けたワークショップ」の開催について 第33回公衆衛生情報研究協議会 2020年1月23-24日、和光市 (口頭)

50) 深野顕人、九十田千子、大嶋美月、大木規央、朴三用、若江亨祥、相崎英樹、脇田隆字、村松正道、渡土幸一. NTCP多量体化によるB型肝炎ウイルス内在化制御機構. 第67回日本ウイルス学会学術集会、03-5-07、東京、(2019/10/29-31) 口頭発表

51) 深野顕人、九十田千子、大嶋美月、大木規央、朴三用、若江亨祥、相崎英樹、脇田隆字、渡土幸一、村松正道. B型肝炎ウイルス内在化機構における感染受容体多量体化の関与. 日本薬学会第140年会、26J-pm03、京都、(2020/3/25-28) 口頭発表

52) 藤井克樹 最近のヒト由来ロタウイルスに見られる

遺伝的特徴の変化 第 31 回ウイルス性下痢症研究会学術集会、神奈川、2019 年 10 月 28 日

53) 藤井克樹、小田真悠子、宗村佳子、新開敬行 2017-2018 年の東京都におけるロタウイルス流行株の全ゲノム解析 第 60 回日本臨床ウイルス学会、愛知、2019 年 5 月 25-26 日

54) ホッサムゲワイド、青柳東代、若江亨祥、有田峰太郎、渡士幸一、鈴木亮介、熊谷佳悟、山地俊之、深澤征義、花田賢太郎、村松正道、脇田隆字、相崎英樹。スフィンゴ脂質の C 型肝炎ウイルス複製における役割の解析。第 29 回抗ウイルス療法学会 学術集会・総会。東京。2019 年 7 月 18 日~20 日。

55) ホッサムゲワイド、青柳東代、有田峰太郎、鈴木亮介、熊谷佳悟、山地俊之、深澤征義、村松正道、脇田隆字、相崎英樹、花田賢太郎。C 型肝炎ウイルス複製膜複合体におけるスフィンゴミエリンの必要性。第 12 回セラミド研究会学術集会。札幌。2019 年 10 月 24 日~25 日。

56) 堀田千恵美、吉田弘 千葉県におけるポリオへの対応—中和抗体保有状況を中心に— 第 78 回日本公衆衛生学会 令和元年 10 月 23-25 日、高知市 (ポスター)

57) Matsuda M、Li TC、Nakanishi A、Muramatsu M、Suzuki T、Suzuki R。Reporter-based neutralization assay for JC polyomavirus。第 67 回日本ウイルス学会、船堀 2019 年 10 月 29-31 日

58) 松永 智子、スタンリー ジェレミア、宮川 敬、西辻裕紀、渡士 幸一、下遠野 邦忠、脇田 隆字、梁 明秀。B 型肝炎ウイルスを感知するカスタマイズ可能なアウトプットを備えた細胞バイオセンサーの開発。第 67 回日本ウイルス学会学術集会。2019. 10. 29-31。東京。

59) 松岡由美子、濱崎光宏、吉田弘 改正感染症法施行後実施した遺伝子解析装置に関する技術管理研修について 第 78 回日本公衆衛生学会 令和元年 10 月 23-25 日、高知市 (ポスター)

60) 宮川 敬、西 真由子、松永 智子、渡士 幸一、脇田 隆字、梁 明秀。プロリン異性化酵素 Pin1 は B 型肝炎ウイルスコア蛋白質の安定性を調節する。第 67 回日本ウイルス学会学術集会。2019. 10. 29-31。東京。

61) 村山麻子、山田典栄、村松正道、加藤孝宣。B 型肝炎ウイルスゲノムの一過性導入による培養細胞での高感染力ウイルスの産生。第 67 回日本ウイルス学会、10 月 29-31 日、東京。

62) 村上耕介、片山和彦。小腸オルガノイドにおける胆汁要求性ヒトノロウイルス GII.3 の複製機序の解析。第 60 回日本臨床ウイルス学会、2019 年 5 月 26 日-27 日、名古屋

63) 村上耕介。国際学会の紹介「第 7 回国際カリシウイルス会議」。ウイルス性下痢症研究会 第 31 回学術集会、2019 年 10 月 28 日、川崎

64) Yato K、Onodera T、Matsuda M、Fujimoto A、Watashi K、Aizaki H、Kato T、Moriishi K、Tamura K、Takahashi Y、Wakita T、Muramatsu M、Suzuki R。Epitope analysis of monoclonal antibodies against hepatitis B virus receptor binding region。第 67 回日本ウイルス学会、船堀 2019 年 10 月 29-31 日 (ポスター)

65) Yato K、Onodera T、Matsuda M、Fujimoto A、Watashi K、Aizaki H、Kato T、Moriishi K、Tamura K、Takahashi Y、Wakita T、Muramatsu M、Suzuki R。Generation and epitope analysis of monoclonal antibodies against hepatitis B virus receptor binding region。第 42 回日本分子生物学会、福岡 2019 年 12 月 2-4 日 (ポスター)

66) 山田典栄、加藤孝宣、奥瀬千晃、鈴木通博、安田清 B 型急性肝炎既往者に対する A 型肝炎の注意喚起。第 55 回日本肝臓学会総会。東京。2019. 5. 30-31。

67) 山田典栄、加藤孝宣、奥瀬千晃。首都圏における B 型肝炎の感染様式と遺伝子型分布の検討。第 23 回日本肝臓学会大会。神戸。2019. 11. 21-24。

68) 横井一、江原勇登、貞升健志、竹内道子、筒井理華、豊嶋千俊、松岡由美子、磯貝達裕、吉田弘、調 恒明。感染症法に基づく病原体等検査に関わる信頼性確保部門担当者向け研修ガイドラインの検討 第 33 回公衆衛生情報研究協議会 2020 年 1 月 23-24 日、和光市 (口頭)

69) 吉田弘、小澤広規、木田浩司、後藤明子、高橋雅輝、筒井理華、濱島洋介、堀田千恵美。環境水サーベイランス

ウイルス第二部

により検出されたエンテロウイルス (2017 年度報告) 第 78 回日本公衆衛生学会 令和元年 10 月 23-25 日、高知市 (ポスター)

70) 吉田弘 世界ポリオ根絶計画の現状と環境水サーベイランスについて第 29 回 日本外来小児科学会年次集会 令和元年 9 月 1 日福岡市 (口頭)

71) 吉田和央、村松正道、水田克巳、清水博之、日本で分離されたエンテロウイルス D68 株に対する IVIG 製剤の中和活性の測定 (ポスター). 第 67 回日本ウイルス学会学術集会, 2019 年 10 月 29 日-31 日、東京

72) 李 瑩芳 遺伝子多型による APOBEC の抗 HBV 作用の違い, 第 92 回日本生化学会大会、横浜、(2019/9/18~20) 口頭発表

73) Laura Navika Yamani, Takako Utsumi, Yen Hai Doan, Yoshiki Fujii, Zayyin Dinana, Rury Mega Wahyuni, Soegeng Soegijanto, Alpha Fardah Athiyah, Soetjipto Soetjipto, Juniastuti Juniastuti, Yujia Liang, Chieko Matsui, Lin Deng, Takayuki Abe, Hirovuki Shimizu, Koji Ishii, Kazuhiko Katayama, Maria Inge Lusida, Ikuo Shoji: Whole genome analysis of G12P [8] rotavirus strains from hospitalized children in Surabaya, Indonesia (インドネシアスラバヤの小児入院症例から採取された G12P[8]株の全ゲノム解析) 第 67 回日本ウイルス学会学術集会、東京、2019 年 10 月 29-31 日

74) 若江亨祥、近藤悟、吉崎智一 EBV-LMP1 は APOBEC の発現プロファイルを変化させる。第 78 回日本癌学会学術総会、京都、(2019/9/25-27)

75) 渡士幸一。Analysis of Hepatitis B virus life cycle and drug discovery. Joint Research center for Human Retrovirus infection. 2020. 1. 24. 鹿児島大学医学部キャンパス.

76) 渡士幸一。B 型肝炎創薬研究の現状と新規標的創出へ向けて。第 55 回日本肝臓学会総会。2019 5. 30. 東京.

77) 渡士幸一。B 型肝炎ウイルスの宿主選り好み。ウイルス研究の潮流シリーズ。2019. 6. 26. 京都大学ウイルス再生医科学研究所.

78) 渡士幸一。B 型肝炎ウイルス受容体共役因子に関して。AMED B 型肝炎創薬等実用化研究事業 (伊藤班)。2019. 7. 4. 愛知医科大学.

79) 渡士幸一。B 型肝炎創薬研究の実際。藤田医科大学セミナー。2019. 6. 25. 藤田医科大学.

80) 渡士幸一。HBV を考える。AMED セミナー。2019. 4. 17. 東京.

81) 渡士幸一。HBV 創薬研究の現状と今後の展開。富士フィルム株式会社 先進研セミナー。2020. 1. 15. 富士フィルム株式会社 先進研.

III. その他

1. 研究会

1) 清水博之。世界ポリオ根絶計画は今どうなっているのか?。ポリオの会定例会 2019 年 7 月 7 日、東京

2) 清水博之。世界ポリオ根絶計画の進捗と停滞。第 18 回ウイルス学夏の学校 みちのくウイルス塾。2019 年 7 月 14 日、仙台

3) 清水博之。ポリオウイルス感染性を有する可能性のある検体のバイオリスク管理 -現実的な対策に向けて- 第 19 回日本バイオセーフティ学会総会・学術集会。ワークショップ 1 ポリオ根絶の最終段階戦略とその実施計画, 2019 年 11 月 19 日、東京

4) Shimizu H. NIID Update. The 24th Polio Research Committee Meeting. Starling Geneva Hotel & Conference Center, Geneva, Switzerland, 6-7 November, 2019

5) 清水博之。世界ポリオ根絶計画最終段階におけるワクチン戦略。第 23 回日本ワクチン学会学術集会シンポジウム 3: 国際化とワクチン, 2019 年 12 月 1 日、東京

6) 清水博之。ポリオ根絶計画の現状と実験室診断。2019 年度 希少感染症診断技術研修会 2020 年 1 月 29 日、東京

7) 吉田弘「病原微生物の環境水サーベイランスについて」宮城県保健環境センター研究会。令和元年 12 月 23 日、

仙台市 講師

- 8) 吉田弘「ポリオの概要と世界の状況」第 22 回バイオセーフティ技術認定更新研修会」R2年 3 月 13 日 東京都、講師

2.新聞取材

- 1) 渡土幸一. B 型肝炎で感染担うたんぱく質発見について. 2019.4.2. 日経新聞.
- 2) 渡土幸一. 細胞が B 型肝炎ウイルスに感染 EGFR が侵入手助け. 2019.4.26. 科学新聞.