

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、経口生ポリオワクチンを検定、検査対象としている。

第1室の最重要課題は経口生ポリオワクチンの検定、検査である。本年は小分製品1件およびバルク1件の検定をおこなった。WHO 世界ポリオ根絶計画が進展し、国産不活化ポリオワクチン開発に協力するための研究を継続している。しかし、当面の間生ポリオワクチン検定も続くことが予想されるため、今後も全力をあげて対応していく。

わが国の食中毒の多くの原因となっているノロウイルスに関しては、全国地研との連携が確立し、感染研はレファレンスセンターとしての機能を良く果たしている。前年度に比較するとノロウイルスの流行はやや落ち着いたが引き続き警戒が必要である。ノロウイルスの研究では、待望のリバースジェネティクス実験系が開発された。今後の進展が大いに期待される。またサボウイルスの研究も進んでいる。

E型肝炎ウイルスの研究は新たな局面を迎えつつある。ウイルス培養系の確立によりウイルスの感染増殖機構の詳細な解析が可能となった。

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。今年度はオーストラリアで、AFP 患者から分離された1型野生株ポリオウイルスの解析を行った。さらに、野生株ポリオウイルス実験室封じ込め活動を進めた。野生株ポリオウイルス実験室封じ込め第一段階調査報告書をWHO 西太平洋地域ポリオ根絶認定委員会に提出した。また、国内エンテロレファレンスセンターとしてレファレンス活動、依頼検査をおこなった。

第3室及び第4室ではC型肝炎ウイルスの研究をおこなった。ウイルス培養系を用いた研究は順調に進み、ウイルスのライフサイクルに関する新たな知見が得られている。予防的ワクチンの開発のための基礎研究も進んだ。さらにB型肝炎ウイルスに関する研究も重点をおいて実施している。また、肝炎ウイルスに関するホームページを立ち上げた。

第5室の最重要課題はA型及びB型肝炎ワクチンの検定、検査である。本年はA型肝炎ワクチン2件、B型肝炎ワクチン10件の検定をおこなった。また、検定SOPの整備を行った。

各室で以下のような国際的技術協力をおこなった。

1. 劉 蘭軍(中国、成都市疾病予防控制中心) <笹川フェロー> 平成19年4月1日~平成20年3月31日、E型肝炎ウイルスの分子ウイルス学とワクチン研究
2. 吳 芳姿(台湾・疾病予防センター) <台湾疾病予防センターフェロー> 平成19年8月19日~19年9月8日、下痢症ウイルスの同定と診断
3. タイラー・シャープ(米国ベ일러医科大学分子ウイルス細菌学講座、メアリー・エステス研究室、JSPS サマープログラム) 平成19年6月19日~8月20日、ノロウイルス非構造蛋白質 p22 (3A-like protein) の性状と機能の解析
4. Nguyen Thi Hien Thanh (ベトナム、HIHE) <JSPSフェロー> 平成19年8月8日~平成19年9月4日、エンテロウイルス感染症の血清疫学および分子疫学に関する研究
5. Rifqiyah Nur Umami (インドネシア、RIPI) <JSPSフェロー> 平成19年10月10日~平成20年1月18日、インドネシアで伝播しているエンテロウイルスの検出・同定法の研究
6. Andi Utama (インドネシア、RIPI) <JSPSフェロー>

平成 19 年 12 月 20 日～平成 19 年 12 月 26 日、インドネシアで伝播しているエンテロウイルスの検出・同定法の研究

7. Guan Jing (中国、新疆自治区疾病予防控センター) <JICA フェロー> 平成 20 年 1 月 21 日～平成 20 年 4 月 18 日、ポリオウイルス実験室診断に関する技術研修
8. Yang DongMei (中国、中国疾病予防控センター) <JICA フェロー> 平成 20 年 1 月 21 日～平成 20 年 4 月 18 日、ポリオウイルスおよびエンテロウイルス実験室診断および分子疫学解析に関する技術研修
9. Bruce Thorley (オーストラリア、VIDRL) <HS フェロー> 平成 20 年 1 月 25 日～平成 20 年 2 月 29 日、オーストラリアで分離されたポリオウイルスの神経病原性の解析

人事面では勝二郁夫第 3 室長が神戸大学微生物学教室に転出し(平成 19 年 10 月 1 日)、米山徹夫第 5 室長が平成 20 年 3 月末をもって定年退官となった。勝二先生および米山先生のこれまでの貢献に深謝したい。また、長期出張中であつた下池貴志主任研究官が米国スタンフォード大学より(平成 19 年 5 月)、片山和彦主任研究官は米国ペイラー大学より(平成 19 年 6 月)、鈴木亮介研究員は米国テキサス大学ガルベストーン校より(平成 20 年 3 月)それぞれ帰国した。

業績 調査・研究

1. 下痢症ウイルスに関する研究

1. ノロウイルス (NoV) に関する研究

(1) ユニークなゲノム末端配列を有するノロウイルス株 HK299 の解析

キャプシド N/S 領域を用いた分子系統解析で、新たなゲノムクラスターに分別されたノロウイルス株 HK299 は、マウスノロウイルスと同じアミノ酸配列 MRM をゲノム末端、キャプシド末端に有するユニークな株である。121 株のカリシウイルスの完全長ゲノム塩基配列を用いて、HK299 と他のノロウイルス株との関係を調べたところ、ヒトノロウイルス、ゲノグループ II に分別された。次にノロウイルスにコードされている 3 つの ORF 別に分子系統解析を行ったところ、ORF2 では新しいゲノグループに分別されたが、ORF1 と ORF3 では、

ゲノグループ II に分別されることが明らかとなった。HK 299 は、ノロウイルスでよく知られている ORF1-2 ジャンクション以外に ORF2-3 ジャンクション領域に組換え部位を持つ可能性がある。HK299 は、ノロウイルスにおけるゲノグループ間組換えの可能性を持つ初めての株である。

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

(2) ノロウイルスの培養細胞への結合の解析

ノロウイルスのレセプターの探索を目指し、培養細胞へのノロウイルス VLPs の結合、細胞への取り込みを蛍光免疫染色法、共焦点レーザー顕微鏡観察、継時的なウエスタンブロッティングによって検出した。ノロウイルス VLP は分化した Caco2 細胞に結合することが示された。共焦点レーザー顕微鏡観察において、微絨毛株の細胞内部、細胞基底面近傍の細胞内部に VLPs のシグナルが検出され、VLPs の細胞内侵入が示唆された。VLPs 添加後 6 時間おきの継時的なウエスタンブロッティングでは、VLPs の形成する約 60kDa のキャプシド蛋白質が細胞への侵入後、時間経過に伴って分解され低分子量化することが観察された。現在、更に細胞への侵入を明らかにするため、Stanporation(細胞に微細な穴を開け、蛋白質を細胞内に導入する技術)を用いて VLPs を直接細胞内に送り込み、比較検討を行っている。サボウイルス VLPs についても同様に結合性、細胞への侵入を検討している。

[松田 幹、村上耕介(名古屋大)、ハンスマン・グラント、岡智一郎、片山和彦、武田直和]

(3) ノロウイルスプロトタイプ RNA の感染性に関する研究

ノロウイルスプロトタイプ NoV GI/1 (NV68/US) が感染した患者の糞便材料から得たノロウイルス粒子より、抽出した NoV ゲノム RNA を培養細胞に導入すると自己増殖し、培養上清中にウイルス様粒子を放出することを昨年報告した。本年度は、培養細胞表面にノロウイルスが結合することが知られている糖鎖抗原を FUT2 遺伝子導入によって細胞に発現させ、NoV 感染細胞を増加させることを試みた。NoV 粒子の再感染を免疫蛍光抗体法で調べた。FUT2 遺伝子を導入した細胞への NoV-VLPs の結合増加は確認されたが、NoV 粒子の感染による蛍光シグナルの増加は認められなかった。培養上清中に放出される粒子に内包された NoV ゲノム RNA のタイターの増加も認められな

かった。ノロウイルスの細胞への侵入には、糖鎖抗原以外の分子、レセプターが関与する可能性がある。今後、Stampration の技術を用いて、ウイルス粒子を直接細胞内部に送り込み、ノロウイルスの増殖の検討を行う予定である。
[スサーナ・ギックス、片山和彦、タイラー・シャープ、メアリー・エステス]

(4) ノロウイルス (NoV) G11/3 U201 株のリバースジェネティックスシステムを用いたレポーター遺伝子内包シールドウイルスの作成

昨年、ヒトに感染するノロウイルスの感染機構や病原性を研究するため、ノロウイルス G11/3 U201 株の完全長 cDNA を用いたリバースジェネティックスシステムを構築した。このシステムは NoV ゲノム RNA を内包した粒子を産生可能であった。そこで、非構造蛋白質領域 (NTPase と 3A-like protein) の間に GFP 遺伝子を組み込んだコンストラクト pKSF203 を作成し、GFP 遺伝子を内包した粒子の作成を試みた。pKSF203 を導入した細胞は、ウイルスの全ての非構造蛋白質および構造蛋白質を効率よく発現した。さらに、構造蛋白質の発現も確認された。培養上清には遺伝子導入後 36 時間をピークに約 10^6 copies/ml の GFP が組み込まれたウイルスゲノムを内包した粒子が観察された。培養上清中のウイルス粒子から抽出した RNA を培養細胞に導入したところ、強い GFP シグナルが観察された。本システムを用いて、GFP 遺伝子を有し自己複製可能なゲノム RNA を内包した人工ウイルスの作成に成功した。人工ウイルスは NoV の細胞への侵入機構の解析、レプリケーションのモニターに有用である。

[片山和彦、岡智一郎、スサーナ・ギックス、タイラー・シャープ、メアリー・エステス]

(5) ノロウイルス非構造蛋白質 (3A-like protein:p22) の性状と機能の解析

ノロウイルスの非構造蛋白質の一つである p22 は、ゲノム上の配置がポリオウイルスの 3A protein に相当するため、3A-like protein とも呼ばれている。しかし、NoV とポリオウイルスの 3A-like protein のアミノ酸ホモロジーが低い事に加え、その機能に関する報告はない。P22 の機能を明らかにするため、GFP-p22 の融合蛋白質を細胞内で発現させ、その挙動を調べた。P22 は、トランスゴルジに局在し、特徴的な顆粒状の構造を呈した。ノロウイルス G1 と G11 の p22 のアミノ酸配

列を比較検討し、全てのノロウイルスに共通して認められる ESDG 配列を見出した。そこで p22 のミュータジェネシスを行い、細胞内局在を検討した結果、ESDG 配列は、局在に必須なトランスメンブレンドメインであることが明らかとなった。また、p22 は膜輸送をになう蛋白質である COP11 と細胞内局在が一致することから、p22 は宿主細胞の膜輸送をコントロールしている可能性がある。

[タイラー・シャープ、片山和彦、岡智一郎、スサーナ・ギックス、メアリー・エステス]

(6) ノロウイルスの細胞傷害性の解析

非構造蛋白質領域 (NTPase と 3A-like protein) の間に GFP 遺伝子を組み込んだコンストラクト pKSF203 を用いてノロウイルス非構造蛋白質の細胞内発現を 48 時間のタイムラプスを行って観察した。非構造蛋白質の発現は、pKSF203 トランスフェクション後 15 時間から観察された。非構造蛋白質の高発現が認められた細胞には強い CPE が誘導され、発現後約 8 時間で細胞死に至った。細胞傷害性に関する非構造蛋白質の部位を明らかにするため、6 種類の非構造蛋白質を EF1 プロモータ下流にクローニングした発現プラスミドを作成し、個別に細胞内に導入して細胞傷害性を観察した。Protease を導入した細胞は導入後 12 時間から核の萎縮が観察され、アポトーシスによる細胞死が観察された。N-terminal protein, NTPase, 3A-like protein にも細胞傷害性の誘導能があることが示唆された。今後、これらの蛋白質による細胞死誘導の機序について研究を進める予定である。

[片山和彦、スサーナ・ギックス、タイラー・シャープ、メアリー・エステス]

(7) 組換えバキュロウイルス発現系を用いた VPg 内包したノロウイルス VLPs の作成

ノロウイルスの構造蛋白質 VP1, 2 を組み込んだ組換えバキュロウイルスと、非構造蛋白質 VPg を組み込んだ組換えバキュロウイルスを昆虫細胞 Sf9 に共感染させ、VLPs を作出すると、比重 1.32g/ml を示す VLPs と、通常の VLPs と同じ比重 1.28-30g/ml を示す VLPs が産生された。VLPs の精製後、VPg のモノクローナル抗体を用いたウエスタンブロッティングで VLPs を調べたところ、比重 1.32g/ml の VLPs には VPg のシグナルが確認された。構造蛋白質と VPg を個別に発現させ、発現蛋白質を混合した後、VLPs の比重を調べると、比重

ウイルス第二部

1.28-30g/ml の VLPs のみが観察された。また、この粒子から VPg のシグナルは検出されなかった。以上の結果から、比重 1.32g/ml の VLPs には、VPg が内包されている可能性がある。今後、VPg に GFP 等の蛍光蛋白質を融合させ、レポーターを内包した VLPs の大量作成を試みる予定である。

[片山和彦、ウェイ・リン、スサーナ・ギックス、タイラー・シャープ、メアリー・エステス]

(8) カリシウイルスファミリーのサブデータベースの構築
世界 3 大データベース上のノロウイルス、サボウウイルスの塩基配列は、日々更新され、現在 10000 を越える塩基配列が報告されている。今後も日々増加していくことが予想される。そこで、これらのデータベース上からノロウイルス、サボウウイルスを含むカリシウイルスファミリーを網羅したサブデータベースを構築し、塩基配列情報の有効活用を促進することを試みた。DDBJ よりカリシウイルスの塩基配列を、オートピックアッププログラムにより、ピックアップし、カリシウェブ (CaliciWeb site, <http://teine.cc.sapmed.ac.jp/~calici/modules/news/>) 上にサブデータベースを構築した。DDBJ に新規登録されたカリシウイルスの塩基配列情報は、上記オートピックアッププログラムにより、毎日、自動更新される。

また、検索ウインドウを用い、目的の塩基配列に素早くアクセスできるプログラムの運用も始まった。今後、ページデザインのリファインと共に、分子系統解析ツールへのアクセスを可能とするリンクの作成などを行う予定である。

[片山和彦、三瀬敬治 (札幌医大) 染谷雄一、武田直和]

(9) ノロウイルスのリファレンスシーケンスとジェノタイプピング法のアップデート

ノロウイルスの分子系統解析は、日本国内では主に我々の提唱した方法に基づき、キャプシドの N/S 領域の約 300 塩基の核酸配列を用いて行われている。しかし、米国 CDC、ヨーロッパのグループはそれぞれ、別のタイピング方法を提唱しており、混沌とした状態に陥っている。そこで、それぞれの方法で共通に用いられている株の配列を基準配列としてリストアップし、分子系統解析に利用可能な基準配列ファイルを作成し、CaliciWeb にアップした。また、それぞれのタイピング法におけるジェノタイプナンバー対応表と、それぞれのタイピング法の解説を IASR および CaliciWeb にアップした。更に、

最新の分子系統解析法をインタラクティブなムービーとしてまとめ、CaliciWeb 上にアップした。

[片山和彦、三瀬敬治 (札幌医大) 染谷雄一、武田直和]

(10) ノロウイルス 3CD 前駆体タンパク質の立体構造解析

ノロウイルス Chiba407 株に由来する 3C 様プロテアーゼの立体構造はすでに明らかになっている。3C 領域に続く 3D RNA 依存性 RNA ポリメラーゼは、3CD 前駆体が更なるプロテアーゼ消化を受けることにより生成することが種々の実験で示唆されている。また、3C と 3CD とでプロテアーゼの性質が変わるという報告もある。3CD 前駆体の立体構造を解明し、3C および 3D の立体構造と比較することは、それぞれの機能を考える上で興味深い。現在、3CD の精製、結晶化を試みている。

[染谷雄一、武田直和、熊坂 崇 (財)高輝度光科学研究センター]

(11) ノロウイルス 3C 様プロテアーゼの網羅的変異導入解析

ノロウイルス Chiba407 株に由来する 3C 様プロテアーゼを構成するアミノ酸残基 (Gly, Ala 以外) を個々に Ala に置換し、プロテアーゼ活性への影響を見た。その結果、Ala 置換により活性を消失するアミノ酸残基は、プロテアーゼ活性発現に必須の His30 と Cys139 のほか、Trp6, Arg8, Trp16, Leu86, Lys88, Arg89, Leu95, Leu97, Met101, Gln117, Leu121, Thr134, Asp138, Tyr143, Val144, His157, Val167 であった。Thr134, Tyr143, His157 は基質認識に関わり、そのほかの多くの残基は活性中心近傍に位置することが立体構造から示された。

[染谷雄一、武田直和]

(12) NoV と血液型抗原との結合 : H 抗原へ結合の解析

血液型抗原はそのコア構造によってタイプ 1、2、3、4 に分類される。組織によって発現されるタイプが異なることから、NoV の組織特異性に関与している可能性もある。NoV が H 抗原におけるタイプ間の構造の差を認識しているかどうかを検討するために、7 種類の Multivalent 合成糖鎖、Fuc 1-2Gal 1-3GlcNAc -R1 (H type 1)、Fuc 1-2Gal 1-4GlcNAc -R1 (H type 2)、

ウイルス第二部

Fuc 1-2Gal 1-3GalNAc -R1 (H type 3) 、 Gal 1-3GlcNAc -R1 (type 1)、Gal 1-4GlcNAc -R1 (type 2) 、 Gal 1-3GalNAc -R1 (type 3) 、 Fuc 1-2Gal -R1 (H(di)) (R1, polyacrylamide with biotin)とVLPsとの結合をELISAにて検出した。VLPsは遺伝子群I(GI)に属する5遺伝子型から5株、遺伝子II(GII)に属する8遺伝子型から11株、計13遺伝子型16株を用いた。その結果、GI3株、GII6株がH type 1、H type 2、H type 3のいずれかと結合した。これら9株についてH抗原の前駆体、type 1、type 2、type 3との結合を解析した結果、9株とも前駆体とは結合しなかった。また、9株中7株は、タイプ毎に異なる結合強度を示し、H抗原におけるタイプ間の構造の差を認識していた。残り2株はいずれのタイプにも強く結合したが、その結合も、H(di)において弱くなり、前述の7株同様、H抗原におけるタイプ間の構造の差を認識していた。

[白土東子、石井孝司、脇田隆字、武田直和]

(13) NoV と血液型抗原との結合：A、B抗原へ結合の解析

NoVがA、B抗原におけるタイプ間の構造の差を認識しているかどうかを検討するために、4種類のMonovalent合成糖鎖、GalNAc 1-3(Fuc 1-2)Gal 1-3GlcNAc 1-3Gal 1-R2 (A type 1)、Gal 1-3(Fuc 1-2)Gal 1-3GlcNAc 1-3Gal 1-R2 (B type 1) 、 GalNAc 1-3(Fuc 1-2)Gal 1-4GlcNAc 1-3Gal 1-R2 (A type 2)、Gal 1-3(Fuc 1-2)Gal 1-4GlcNAc 1-3Gal 1-R2 (B type 2) (R2, biotin)とVLPsとの結合をBiacoreおよびELISAにて検出した。VLPsは上記(1)と同じ13遺伝子型16株を用いた。その結果、16株中、6株の糖鎖結合をBiacoreにて検出することが出来た。A抗原に結合した6株はいずれも、その結合速度はtype 1よりtype 2の方が高く、B抗原に結合した2株もその結合速度はtype 1よりtype 2の方が高かった。しかし、解離の速度はtype 1の方が低く、ウイルス-糖鎖複合体の安定性はtype 1の方が高かった。以上の結果より、NoVは、A、B抗原のタイプ間の違いを認識していることが明らかとなった。タイプ1はNoVが感染の標的とする小腸上皮に発現している。血液型抗原がNoVの組織指向性を左右している可能性がある。

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

(14) 紫外線照射によるNoroviruses不活化の検討-5
昨年まではI県Y町の漁業集落排水施設に紫外線照射装置を設置し実際の排水を使用して紫外線照射のNoroviruses不活化効果をReal time PCR法で検査したが、紫外線不活化効果が得られたため本年度は別の県において実機に紫外線照射装置を設置して実態調査を行なった。山陰地方のF県の下水処理施設に装置を設置し昨年と同様紫外線を約70mJ/cm²及び100mJ/cm²照射前後のサンプルを採水し検査を行なった。昨年迄と同様流入水中のNoroviruses遺伝子レベルは200N500copies/Lと低レベルであったが、75ミリジュールの紫外線照射後は全く検出されなかった。我々が推奨している紫外線照射量でNoroviruses不活化効果が確認できた。

[宇田川悦子]

(15) High-resolution melting (HRM) analysisを用いたノロウイルス遺伝子検出法の検討

NVの遺伝子型GI型(GI/3, GI/4, GI/8, GI/9)及びGII型(GII/3, GII/4, GII/10)の合計7種類のプラスミドを作成し、 Φ 31のRt-PCR装置を用いて定量用コントロール・プラスミド標準品と比較・検討を行った。検査したGI遺伝子型のプラスミドについて 1×10^7 copies/tubeから10 copies/tubeの範囲内でサイクル数に比例したDNA量の増幅曲線が得られた。縦軸にPCRサイクル数をとった検量線においても直線性はコントロール・プラスミド標準品の結果と良く一致した。GII型においても同様の結果が得られた。今後更に患者材料などを用いた検討を行なう予定である。

[宇田川悦子、原正幸(北里環境科学センター)]

(16) 国内で分離されたマウスノロウイルスのゲノム解析

2006年に日本国内のマウスの糞便から初めて分離されたマウスノロウイルスのゲノム塩基配列を決定した。この株は培養細胞での増殖が可能であることから、ヒトのノロウイルス研究のモデルとして有用である。

[岡智一郎、片山和彦、高木弘隆(バイオセーフティー管

理室) 遠矢幸伸(東大院獣医) 武田直和]

Hansman S. Grant、武田直和]

2. サポウイルス(SaV)に関する研究

(1) 散発性胃腸炎糞便中のサポウイルスの解析(熊本)

2002年4月から2007年3月に熊本県内の2つの小児科に急性胃腸炎の症状で受診した外来患者糞便417検体について、nested RT-PCR法、およびreal-time RT-PCR法によるサポウイルスの検出、解析を行い、30検体(7.2%)でサポウイルス陽性となった。検出されたサポウイルスはGgenogroup Iが17株、IIが10株、Vが3株で、ウイルス排泄量は糞便1g中 1.8×10^5 ~ 4.2×10^{10} コピーであった。今回の解析により、この地域におけるサポウイルスの検出率が2005年以降漸増傾向にあること、散発事例糞便中ウイルス排泄量は、集団発生事例糞便中のウイルス排泄量と同レベルであることが明らかとなった。

[原田誠也(熊本県保健環境科学研究所)、岡田峰幸(千葉県衛生研究所)、岡智一郎、Hansman S. Grant、片山和彦、武田直和]

(2) サポウイルス集団発生事例の解析(北海道)

2007年5月に北海道の社会福祉施設で発生したサポウイルス集団発生事例の解析を行った。検出されたサポウイルスはGenogroup IIで、ウイルス排泄量は糞便1g中 5.2×10^6 ~ 2.9×10^9 コピーであった。感染パターンから、この事例はヒト-ヒト感染である可能性が示唆され、サポウイルスもノロウイルスと同様の伝播経路で感染が拡がると考えられた。

[石田勢津子、吉澄志磨、三好正浩、奥井登代、岡野素彦(北海道立衛生研究所)、岡智一郎、Hansman S. Grant、片山和彦、武田直和]

(3) サポウイルスの培養細胞への結合の解析

サポウイルスの細胞結合因子の探索、および結合阻害物質の検索を目指し、まず培養細胞へのサポウイルスvirus-like particles (VLPs)の結合を蛍光免疫染色法で検出した。サポウイルスVLPsは、ノロウイルスVLPsが結合する分化したCaco2細胞には、結合しないことが示された。ノロウイルスとサポウイルスでは異なる細胞表面因子が結合に関与している可能性が示唆された。

[村上耕介、松田 幹(名古屋大)、片山和彦、岡智一郎、

(4) サポウイルス株間の抗原多様性に関する研究

サポウイルスの抗原多様性を検討する目的で、同一genogroupで異なるgenotypeに属するサポウイルス株(Mc10、C12、Syd53、Mc2)のVLPsを哺乳動物細胞で発現させた。さらにMc10株、C12株VLPsに対する抗体を作成し、ELISA法によってこれらの2つの株の抗原性が異なることを示した。サポウイルスもノロウイルスと同様、抗原的に多様であることが示された。

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

(5) サポウイルス粒子形成機構の解析

サポウイルスの構造タンパク質は他のカリシウイルス同様、サブゲノムから翻訳されると考えられている。しかしサポウイルスのopen reading frame 1には構造タンパク質が非構造タンパク質とともにin-frameでコードされており、自己プロテアーゼによってサブゲノム由来とほぼ同一サイズの構造タンパク質が生成する。従来、サポウイルスのVLPs作成はサブゲノム領域を発現させることで行われてきた。今回、partialなORF1ポリプロテインを哺乳動物細胞で発現させ、ポリプロテインから切断された構造タンパク質もサブゲノム由来の構造タンパク質と同様にVLPsを形成できることを明らかにした。

[岡智一郎、山本真民、宮下佳奈、Hansman S. Grant、片山和彦、武田直和]

(6) サポウイルスプロテアーゼのトランス切断活性の検討

サポウイルスのプロテアーゼによるopen reading frame 1ポリプロテインの切断は主にシス(分子内)で起こると考えられている。今回、サポウイルスプロテアーゼのトランス(分子間)切断活性について検討した。プロテアーゼ活性を消失させたサポウイルス3株(GI Mc114株、GII Mc10株、GV NK24株)のpartial ORF1ポリプロテイン(ProPol/VP1)を基質に、サポウイルス3株(GI Mc114株、GII Mc10株、GV NK24株)のORF1ポリプロテインをプロテアーゼ供給源として作用させ、トランス切断活性を評価したところ、いずれの鋳型、プロテアーゼの組み合わせでもProPol/VP1間の切断が認められた。現在、

他の部位についてもトランス切断が起こるか検討を進めている。

[岡智一郎、片山和彦、武田直和]

(7) サポウイルスプロテアーゼの基質との結合モデルの構築

サポウイルスプロテアーゼの基質認識メカニズムを検討するため、統合計算化学システム MOE を用いて SaV プロテアーゼドメインの分子モデルを構築後、ASEDock2005 を用いて ORF1 ポリプロテイン切断部位 6 箇所それぞれの P4-P4 に対応する 8 残基とプロテアーゼドメインのドッキングモデルを作成した。この結果、基質認識に重要と考えられるプロテアーゼドメイン内部のアミノ酸残基を同定した。現在、これらのアミノ酸残基に変異を導入し、プロセッシングへの影響を検討している。

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

(8) Human Sapovirus in clams, Japan

Human sapovirus was detected in 4 of 57 clam packages by RT-PCR and sequence analysis. This represents the first finding of sapovirus contamination in food. More importantly, closely matching sequences have been detected in stool specimens from patients with gastroenteritis in Japan, indicating a possible food-to-human transmission link.

[Grant S. Hansman, Tomoichiro Oka, Reiko Okamoto, Tomoko Nishida, Shoichi Toda, Mamoru Noda, Daisuke Sano, You Ueki, Takahiro Imai, Tatsuo Omura, Osamu Nishio, Hirokazu Kimura, and Naokazu Takeda]

(9) Outbreak of gastroenteritis due to Sapovirus

An outbreak of gastroenteritis occurred at a kindergarten in Yokote City, Japan, between February and March 2006. Sapovirus was identified in 19 of 26 stool specimens by RT-PCR. A high viral shedding pattern was found for this strain, which was shown to be antigenically distinct from other genogroups.

[Grant S. Hansman, Hiroyuki Saito, Chihiro Shibata,

Shizuko Ishizuka, Mitsuaki Oseto, Tomoichiro Oka, and Naokazu Takeda]

(10) Recombinant Sapovirus gastroenteritis, Japan

We described two different sapovirus outbreaks of gastroenteritis in Hokkaido, Japan. Sequence analysis showed 9 sequences from the first outbreak (May 2000) had 100% nucleotide identity and likely represented the same sapovirus strain. Seven sequences from the second outbreak (December 2005) had 100% nucleotide identity and likely represented the same sapovirus strain, but were different from the first outbreak sequence. Importantly, these two different sapovirus strains were found to be different recombinant sapoviruses.

[Grant S. Hansman, Setsuko Ishida, Shima Yoshizumi, Masahiro Miyoshi, Tetsuya Ikeda, Tomoichiro Oka, and Naokazu Takeda]

(11) Antigenic Diversity of Human Sapoviruses

We newly expressed sapovirus GII and GIV VLPs in order to compare the genetic and antigenic relationships among all human sapovirus genogroups. Hyperimmune antisera that were raised against the VLPs reacted strongly against the homologous VLPs. However, several antisera weakly cross-reacted against heterologous VLPs using an antibody ELISA. On the other hand, an antigen ELISA showed that the sapovirus VLPs belonging to all human genogroups were antigenically distinct. These findings provide evidence of a likely correspondence between the sapovirus antigenicity and VP1 genogrouping and genotyping.

[Grant S. Hansman, Tomoichiro Oka, Naomi Sakon, and Naokazu Takeda]

3. ネコカリシウイルスに関する研究

(1) ネコカリシウイルス(FCV)プロテアーゼのトランス切断活性

FCV のプロテアーゼは protease-polymerase (ProPol)

として存在する。このうち、プロテアーゼ活性発現に必須な最小領域が前半の 154 アミノ酸であることを明らかにしてきた。今回、FCV プロテアーゼのトランス切断活性を検討し、FCV の ORF1 ポリプロテイン、および構造タンパク質が、ORF1 ポリプロテイン由来のプロテアーゼにより、効率的にトランス切断されること、プロテアーゼ最小領域も同様のトランス切断活性を有することを明らかにした。

[岡智一郎、片山和彦、武田直和]

4. カリシウイルスに関する研究

(1) 国内で分離されたラゴウイルスのゲノム解析および、全長クローンの作製

ラゴウイルスはカリシウイルス科に属し、サポウイルスと同様のゲノム構造を有する。今回、2002 年に北海道の動物園で飼育されていたウサギから分離されたウサギ出血病ウイルスのゲノム塩基配列を決定した。さらに、ORF1 ポリプロテインのプロセッシング産物の解析および、プロテアーゼ活性発現に重要なアミノ酸残基を検討する目的で、全長クローンを作製した。現在、プロテアーゼ活性発現に重要なアミノ酸残基の検討を行っている。[岡智一郎、池田秀利、吉井雅晃、恒光 裕 (動物衛生研究所)、片山和彦、武田直和]

(2) カリシウイルスプロテアーゼの基質認識機構の共通性

カリシウイルスには 4 つの属 (サポウイルス、ノロウイルス、ベジウイルス、ラゴウイルス) に分類される。カリシウイルスの複製、増殖には open reading frame 1 にコードされているウイルス自身のプロテアーゼが必須である。カリシウイルスプロテアーゼはいずれも特定のグルタミン酸もしくはグルタミンの直後を切断するが、これらのプロテアーゼの基質認識機構の共通性については不明な点が多い。今回、プロテアーゼ活性を消失させたサポウイルスの partial ORF1 ポリプロテイン (ProPol/VP1) を基質に、サポウイルス、ノロウイルス、ネコカリシウイルスの ORF1 ポリプロテインをプロテアーゼ供給源として作用させ、トランス切断活性を評価したところ、サポウイルスとネコカリシウイルスのプロテアーゼではサポウイルス ProPol/VP1 間のトランス切断

が認められた。一方、ノロウイルスプロテアーゼはこの切断活性を示さなかった。これらの結果から、カリシウイルスプロテアーゼの基質認識機構 (切断部位周辺アミノ酸の重要性、基質結合部位) は同一でないことが示された。

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

11. 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。2007 年度は、エンテロウイルス単味抗血清 60 種類、コクサッキー A 群同定用 CF 腹水 2 セットを配布した。ポリオウイルスの同定および型内株鑑別検査を行政検査として実施した。検査したポリオウイルスすべてがワクチン株であった。

(2) ポリオ実験室診断技術研修会 (JICA 共催) の開催

第 17 回ポリオ実験室診断技術研修会を実施した。研修期間は 2008 年 1 月 15 日 ~ 2 月 9 日、研修参加者は、アルバニア、コートジボワール、エジプト、ガーナ、モンゴル、パキスタン、ナイジェリアから各 1 名の計 7 名の他、個別研修として中華人民共和国からの参加者 2 名の計 9 名であった。WHO ポリオ実験室ネットワークにおける国家ポリオ実験室に必要とされる、急性弛緩性麻痺サーベイランスにより得られた糞便検体からのポリオウイルス分離・同定に必要な技術習得のための講義及び実習を実施した。また、ポリオ根絶の現状と問題点を中心とした講義および討議を行った。本年度は、とくに、WHO ポリオ実験室ネットワークで現在導入がすすめられている、ポリオ実験室診断の迅速化について、WHO 専門家を交えた情報交換および討議を実施した。

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

ア) National Polio Laboratory が存在しないラオス・カンボジアの National Polio Laboratory として実験

ウイルス第二部

室診断を行った。本年度はカンボジア 200 検体およびラオス 60 検体の AFP 由来糞便検体からポリオウイルスの分離および同定を行った。

イ) WHO GSL として、おもにカンボジア・ラオス・ベトナム、オーストラリア等で分離されたポリオウイルスについて型内鑑別あるいは塩基配列解析を行った。2007年にオーストラリアで分離された1型野生株ポリオウイルスは、パキスタンで伝播している地域固有の野生株ポリオウイルスであることを塩基配列の解析結果から確認した。他のポリオウイルス分離株は、すべてワクチン株であり、西太平洋地域におけるポリオフリーを確認した。

ウ) WHO Enterovirus Collaborating Center として、西太平洋地域における非ポリオエンテロウイルス感染症のサーベイランスおよび実験室診断を行った。特に遺伝子解析による非ポリオエンテロウイルスの実験室診断法に関する研究を行った。

エ) JICA エチオピア国ポリオ対策プロジェクトのフォローアップ調査のため、2007年5月14日 - 5月25日にかけて、エチオピア国立保健栄養研究所等を訪問し、ポリオ実験室の現状および問題点について評価を行ない、JICA への報告を行った。[清水博之]

オ) 2007年6月27 - 6月29日に行われた WHO ポリオ実験室担当者非公式会議(ジュネーブ)に参加し、ポリオ根絶およびポリオ実験室診断に関する情報交換を行った。[清水博之]

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

キ) 中国 VPDs プロジェクトの後方支援として、中国 CDC、新疆 CDC より各1名、3ヶ月間の研修を行った。[吉田弘、有田峰太郎、西村順裕、清水博之]

2. 西太平洋地域の 2007 年のポリオウイルス分離状況

2007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 260 糞便検体について、ウイルス分離検査及びポリオウイルスの型内株鑑別を行なった。野生株ポリオウイルスは検出されなかった。2005年12月~2006年

1月にかけて、カンボジアの AFP 患者 2 例より分離された 3 型ポリオウイルスは、型内鑑別および塩基配列解析の結果、3 型 VDPV と同定されたため、追加サーベイランスを実施したが、2007年以降 VDPV は分離されておらず、VDVD 伝播終息が確認された。ベトナム、オーストラリア等で AFP および非 AFP 検体から分離されたポリオウイルスの型内鑑別あるいは塩基配列解析を行なった。

[清水博之、吉田 弘、有田峰太郎、西村順裕、和田純子、脇田隆字]

3. 世界ポリオ根絶計画に関わる研究

(1) オーストラリアで分離された 1 型野生株ポリオウイルスの解析

オーストラリアに滞在しているパキスタン人留学生が、パキスタンに一時帰国後 AFP を発症し、2007年7月、オーストラリア RRL において 1 型野生株ポリオウイルスが分離された。オーストラリア RRL および感染研において塩基配列解析を行ったところ、現在パキスタンで伝播している 1 型野生株ポリオウイルスと高い同源性を有することが明らかとなった。患者周辺のサーベイランスでは野生株ポリオウイルスの伝播は認められなかったが、ポリオフリーの地域においても、ポリオ流行地からの AFP 患者の渡航による野生株ポリオウイルス伝播の可能性について留意する必要があることが示された。

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

(2) オーストラリアで分離されたポリオウイルスの病原性解析

オーストラリアで、AFP 患者等から分離されたポリオウイルスについて、TgPVR21 マウスを用いた神経病原性解析試験を実施した。ポリオウイルス分離株は、TgPVR21 マウス(1群6匹)に脳内接種し、弛緩性麻痺等、神経症状の発現および致死的症状についての観察を、接種後 14 日間行った。各群投与群について、麻痺等の神経症状および死亡したマウスの匹数を確認し、PD₅₀ 値を算出した。その結果、2002年に分離された 3 型ワクチン関連ポリオウイルス株および 2007年に分離された 1 型ポリオウイルス野生株は、対照としたポリオウイルス野生株と同等の高い神経病原性を示すことが明らかとなった。他の 2 株の 3 型ポリオウイルスは、ワクチン株と比較すると高い

が、野生株と比較すると低い、中程度の病原性を有していた。

[西村順裕、清水博之、Bruce Thorley (VIDRL)]

(3) Sabin 株由来不活化経粘膜ポリオワクチンの有効性評価

Sabin 株由来 IPV の経粘膜ワクチンへの応用の可能性について検討を行うため、TgPVR21 マウスに対し Sabin 1 株由来 IPV (IP-110) を 3 週間隔で経鼻免疫した。免疫には IP-110 単独あるいはコレラトキシン B subunit をアジュバントとして加えたものを用いた。最終免疫 3 週後に、PV1-Mahoney 株を経鼻接種し、麻痺発症率、PV 特異的 Ig 抗体価の測定と鼻腔における局所の免疫反応について組織学的に検討した。強毒株接種後 14 日以内に、非免疫群では 100%が弛緩性麻痺を発症し、IP-110 単独免疫群では 70%、アジュバント添加 IP-110 免疫群では 10%が発症した。また、免疫群はいずれも感染後 3 日目の血中 PV 特異的 Ig 抗体と鼻腔分泌液中の特異的 IgA の上昇がみられ、アジュバント添加群の血中 IgM、IgG および鼻腔分泌液中 IgA が有意に高かった。ポリオ根絶後、Sabin 株 IPV 導入の必要性が指摘されており、経鼻接種は、新たな IPV 接種法としての可能性が期待できる。

[永田典代、長谷川秀樹、佐多徹太郎 (感染病理部)、清水博之]

(4) ポリオ生ワクチン接種率全国累積調査

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

[高山直秀 (都立駒込病院)、清水博之、宮村達男]

(5) 中国における環境ウイルスサーベイランス手法導入に関する研究

ポリオ野生株が根絶された地域におけるサーベイランス、集団免疫状況の Quality 調査を行うため中国 C D

C と協力して環境ウイルスサーベイランス導入妥当性の研究を開始した。山東省 C D C、広東省 C D C において陰電荷膜を用いた水濃縮システムの導入を図った。2008 年 2 月よりサンプリングが開始され、ウイルスが分離されているところである。

[吉田 弘、帖佐 徹 (国立国際医療センター)]

(6) 不活化ウイルスを用いたポリオウイルス核酸検査標準品の評価

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

[清水博之]

4. エンテロウイルスおよびパレコウイルスに関する研究

1. ポリオウイルスに関する研究

(1) 不活化ポリオワクチンの免疫原性試験に関する研究

不活化ポリオワクチンの免疫原性試験は、検体をラットに筋肉内注射し、血中に誘導される中和抗体価を測定する方法で行なわれる。国内参照品の安定性を評価し、-80 °C では少なくとも一年間は免疫原性が安定に保たれていることを確認した。また、低温凍結で長期にわたり性状が極めて安定である弱毒生ポリオ株が免疫原性試験のキャリブレーターとなりうるかを検討した。

[白土東子、李 天成、小西恭子、岡 智一郎、染谷雄一、宇田川悦子、片山和彦、グラント・ハンスマン、武田直和、脇田隆字、須崎百合子、網 康至 (動物管理室)]

2. エンテロウイルスおよびパレコウイルスに関する研究

(1) エンテロウイルス 71 結合レセプターの探索

当室にてエンテロウイルス 71 粒子に特異的なモノクローナル抗体が作製された。そのモノクローナル抗体を用

いて、エンテロウイルス 71 結合レセプターの同定を試みている。その手順は以下の 4 ステップである。1) エンテロウイルス非感受性細胞に、感受性細胞由来ライブラリーを発現。2) 抗エンテロウイルス 71 抗体を介して、エンテロウイルス 71 粒子をシャーレに固定。3) 1) のライブラリー発現細胞を 2) のプレートでパンニング。4) プレートに残った細胞から cDNA を単離・同定。現在、様々な cDNA ライブラリーを用いてクローニングを試みている。

[西村順裕、下島昌幸(東大医科研)、脇田隆字、清水博之]

(2) エンテロウイルス擬似粒子を用いた抗エンテロウイルス薬の探索

ポリオウイルス(PV)及びエンテロウイルス 71(EV71)の感染増殖を阻害する化合物の探索を目的として、Sigma LOPACK¹²⁸⁰ ドラッグライブラリーを用いて、各々の擬似粒子感染によるルシフェラーゼ活性発現を指標とした阻害剤スクリーニングを行った。その結果、擬似粒子感染細胞のルシフェラーゼ活性を顕著に低下させた薬剤 3 種類および同定した薬剤の構造類似化合物中から抗 EV71 活性を有する 1 種類の薬剤を同定した。同定した薬剤のうち、1 種類は PV および EV71 の感染とともに抑制したが、3 種類は EV71 感染のみを特異的に抑制した。3 種類の抗 EV71 化合物の標的部位について、薬剤耐性ウイルスを用いて解析し、作用部位を特定した。

[有田峰太郎、脇田隆字、清水博之]

(3) GW5074 の抗エンテロウイルス活性に関する解析

ウイルス疑似粒子を用いたスクリーニングにより、ポリオウイルス (PV) およびエンテロウイルス 71 (EV71) の感染を阻害する化合物の探索を行い、Raf-1 阻害剤として知られる GW5074 を同定した。GW5074 の RD 細胞における PV および EV71 に対する IC₅₀ は 2.7 μM および 2.0 μM であり、他の細胞株 (HEp-2c およびマウス L20B 細胞) における PV に対する IC₅₀ の値も同程度であった。GW5074 の存在下で PV および EV71 の経代を続けた結果、12 回の経代で GW5074 に対して耐性を示す変異株は分離されなかった。よって、GW5074 は宿主細胞もしくはウイルスタンパクの中で極めて保存された部位をターゲットとして、

PV および EV71 の複製を阻害していることが示唆された。今後、GW5074 のウイルス複製阻害効果についてさらに解析を進める予定である。

[有田峰太郎、脇田隆字、清水博之]

(4) エンテロウイルス 71 のマウス感染モデルの解析

エンテロウイルス 71 (EV71) の病原性を反映する感染動物モデルの確立を目的として、これまでに NOD/SCID マウスへの EV71 の感染系を確立し、NOD/SCID マウスにアダプトした EV71 変異株を分離およびアダプトに必要とされる変異を同定した。マウスにアダプトした EV71 株にポリオウイルス Sabin 1 株の持つ弱毒化変異を導入し、変異株のマウスにおける組織特異性および弱毒化について解析を行った。その結果、ポリオウイルス Sabin 1 株の弱毒化変異により、EV71 は NOD/SCID マウスにおいても弱毒化されること、弱毒化には導入した弱毒化変異の協調的な作用が必須であることが明らかとなった。変異株の組織特異性は、ヒトおよびサルと異なることが見いだされた。

[有田峰太郎、網 康志(動物管理室)、脇田隆字、清水博之]

(5) CODEHOP 法による、糞便検体からのエンテロウイルス高感度検出の検討

近年、Nix らにより、エンテロウイルスの VP1 コード領域のゲノムを高感度に増幅する方法 (VP1 CODEHOP PCR) が発表された。この方法を用いると、ウイルスを培養細胞で増やすことなく、便乳剤から直接の PCR により、VP1 遺伝子の増幅、シークエンス、ゲノタイピングができると思われる。そこで、便乳剤からの VP1 CODEHOP PCR がどの程度有効であるのか、基礎データの蓄積を試みた。その結果、細胞培養で頻繁に分離されるエンテロウイルスのみならず、コクサッキーウイルス A1 型、コクサッキーウイルス A19 型などの、細胞培養では増殖しないと報告されているエンテロウイルス群も多数検出された。このように、VP1 CODEHOP PCR は、培養細胞で増えないエンテロウイルスの検出および同定にも役立つことが確認できた。今後さらに検体数を増やし、未知のエンテロウイルスの検出・同定や疾病との関わりを調査していく予定である。

ウイルス第二部

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

(6) インドネシアに伝播しているエンテロウイルス検出および同定法の研究

熱帯地方で伝播している腸管ウイルス病原体サーベイランスシステムの構築のため、エンテロウイルス病原体サーベイランス手法についての基礎的検討を実施した。糞便検体から、直接エンテロウイルス遺伝子を高感度に検出・同定する VP1 CODEHOP PCR により、インドネシア国内由来 82 検体の解析を行った。82 検体のうち 28 検体からエンテロウイルス遺伝子の検出・同定が可能であった (検出率 35%)。塩基配列および相同性解析によるエンテロウイルス同定の結果、ポリオウイルス 1 型 2 株を含む 14 種類の血清型のエンテロウイルスおよびライノウイルスが検出された。CODEHOP PCR によるエンテロウイルス同定は、腸管感染症の病原体サーベイランス手法として有用であり、ウイルス分離同定の設備が整備されていない研究室にも比較的容易に導入可能であった。また、インドネシアでは、多様な血清型・遺伝子型のエンテロウイルスが伝播していることが明らかとなった。

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

(7) 上気道炎患者由来検体からの高感度エンテロウイルス検出法に関する検討

エンテロウイルスの検出・同定手法として、組織培養による分離・同定が行われてきた。しかし、検査に長時間を要し、さらに、培養細胞で分離困難なウイルスが存在するなどの問題点がある。培養細胞で分離困難なウイルス、特にコクサッキーウイルス A に属するウイルスは、乳呑みマウスを用いて分離同定が行われてきたが、培養細胞を用いた方法よりさらに煩雑である。臨床検体からの CODEHOP-PCR 法を用いたエンテロウイルス高感度検出法の比較検討を行うため、培養細胞を用いて上気道炎患者検体からのウイルス分離・同定を行った。上気道炎と診断された患者 157 名うち、49 名 (31%) からエンテロウイルスが分離された。分離された 49 株のうち、48 ウイルスは HEV B に分類され、HEV A に属するウイルス 1 株は CV-A3 株であった。

[吾郷昌信 (長崎県環境保健研究センター)、西村順裕、清水博之]

(8) ベトナムで分離された EV71 の分子疫学解析

近年東アジア諸国では、大規模な手足口病流行の際に死亡例を伴う重篤な中枢神経疾患患者の多発が報告されており、ベトナムにおいても小児を中心とした原因不明の急性脳炎の流行が報告されている。ベトナム全土において、手足口病および急性脳炎を発症した小児から分離されたエンテロウイルスの同定を行い、エンテロウイルス 71 およびコクサッキー A16 を検出した。エンテロウイルス 71 の分子系統解析を行ったところ、ベトナムの EV71 分離株の多くは genogroup C に属するベトナム固有の新たな subgenogroup である C5 に属することが明らかとなった。

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

(9) 家族内感染による成人 EV71 脳炎の解析

近年東アジア諸国では、大規模な手足口病流行の際に死亡例を伴う重篤な中枢神経疾患患者の多発が報告されており、その多くは EV71 急性脳炎症例であると考えられている。EV71 脳炎は 5 歳以下の小児に高頻度に認められ、成人における EV71 重症例の報告は、きわめてまれである。本事例においては、母親が EV71 急性脳炎を発症し、同時期に手足口病を発症した 3 人子供の子供からもエンテロウイルス 71 が検出された。分離ウイルスの遺伝子解析により、家族内感染が強く示唆され、近年日本で多く分離されている subgenogroup C4 に属する EV71 による家族内感染であることが明らかとなった。

[浜口 毅 (金沢大学)、西村順裕、清水博之]

(10) 日本におけるパレコウイルス抗体保有状況の解析

ヒトパレコウイルス (HPeV) は、我が国では、HPeV1 型、3 型、4 型、6 型が分離されており、急性胃腸炎や呼吸器症状患者からの報告が比較的多いが、脳炎や髄膜炎患者からの分離も報告されている。パレコウイルス (HPeV) 各血清型の伝播状況を把握するため、年齢別健康人血清を用いて HPeV1 ~ 3 型の抗体保有状況を解析した。HPeV1 型

ウイルス第二部

の抗体保有率は平均 93%で、HPeV3 型は 72%であった。HPeV1 型と HPeV3 型は国内に広く蔓延している可能性があり、乳幼児期に不顕性感染していることも示唆された。HPeV2 型の抗体保有率は平均 21%と低く、6 歳から 15 歳までの抗体保有率は 36.5%で乳幼児期の不顕性感染が推測されるが、15 歳から 50 歳未満の抗体保有率は 10%と低く、HPeV2 伝播は少なくなっているものと考えられた。

[町田早苗 (埼玉医大)、西村順裕、清水博之]

5. ポリオウイルスのバイオセーフティ及びバイオセキュリティシステムに関する調査研究

(1) 日本におけるポリオウイルス野生株保有調査

野生株ポリオウイルス実験室封じ込め活動は、世界的基準に基づいた病原体管理体制の日本国内での構築および病原体管理体制の外部評価システム確立のためのモデルとして重要である。2000～2007年にかけて実施された複数の野生株ポリオウイルス保有施設調査手法についての質的評価を行い、各調査結果の確認、照合、統合作業を実施し、最終的な保有施設リストをデータベース化した。これまでに実施された複数のポリオウイルス保有施設調査の評価・再集計により作成された野生株ポリオウイルス保有施設リストに基づいて、野生株ポリオウイルス実験室封じ込め第一段階調査報告書(ドラフト)を作成し、2007年12月に開催されたWHO西太平洋地域ポリオ根絶認定委員会に提出した。今後、WHO西太平洋地域事務局、地域ポリオ根絶認定委員会、専門家委員会等により、報告書の外部評価が行われる予定である。

[清水博之、宮村達男]

(2) ポリオウイルス野生株保有に関するアンケート調査

「病原微生物の取扱いにおけるバイオセーフティの強化及びバイオセキュリティシステムの構築に関する研究」研究班による、地方衛生研究所へのアンケート調査における追加調査項目として、ポリオウイルス実験室封じ込めについてのアンケートを実施した。1990～2006年に公表された、ポリオウイルス関連原著論文により抽出した 121 施設のうち、電話聞き取り調査およびアンケート調査によって、回答者 107 名のうち、計 16 施設が野生株

ポリオウイルスあるいは野生株ポリオウイルスを含む可能性のある材料を保有していることが明らかとなった。回答 62 施設中 17 施設が、過去、他のルートによるポリオウイルス保有調査を受けた経験がないと回答し、19 施設は過去の調査について不明と回答したことから、今回の捕捉調査は、保有施設調査の精度向上に寄与すると考えられた。半数の研究施設 (8/16 施設) が、今後適切な要請があれば、野生株ポリオウイルスを廃棄する予定があると回答した。不要なポリオウイルス感染性材料の適切な方法による廃棄は、今後の封じ込め対策にとって重要な課題となる。

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

(3) 野生株ポリオウイルス実験室封じ込め活動に関する WHO との協議

2007 年 9 月、WHO 西太平洋地域の野生株ポリオウイルス実験室封じ込め活動の担当者と、今後の野生株ポリオウイルス実験室封じ込め第一段階調査に関する方針についての打合せを実施した。我が国の野生株ポリオウイルス実験室封じ込め活動の現状に対する WHO 専門家による主要な勧告は以下の通りである。1)日本での、これまでの調査活動・調査結果を活用することにより、早急に第一段階調査を完了させる必要がある。2)WHO ガイドラインに基づいて、これまでの各種調査結果を評価し行動計画を策定する。3)各種調査結果の質的評価により、外部評価に相応しい調査精度を保証する。

[清水博之、宮村達男]

6. その他

(1) 電子顕微鏡によるウイルス診断の世界レベルでの品質評価研究(External Quality Assessment of EM Virus Diagnostics: EQA-EMV)

前回に引き続き、本研究所を含む世界各国【26 カ国 93 施設 (独 ; 39、EU 内 ; 32、極東 EU ; 4 とその他 18)】に対しホルマリン不活化標準ウイルスが頒布された。我々はその検体について電子顕微鏡観察下でウイルスの確定診断を行い研究班へ報告した。結果として、分与された 6 検体中 5 検体の結果が一致した。この検体中一検体はウイルス粒子が存在せず、確認したところ他の研究所で

も同じであった。輸送中のサンプルの保管状況などが影響してウイルス粒子が壊れ観察が出来なくなる事が毎年起こっており今後の課題として大きく取り上げられた。総ての結果は他の研究所の結果と良く一致した。

[宇田川悦子、Lars Muller (Robert Koch-Institut)]

(2) バイオテロ等健康危機発生時の電子顕微鏡的ウイルス検査の精度管理-3 (最終年度)

昨年に引き続き、厚生労働科学研究の一環として「バイオテロ等健康危機発生時の電子顕微鏡的ウイルス検査の精度管理」(小倉肇分担研究班)を全国の衛生研究所を対象として実際のウイルス試料を配布して精度管理を行なった。最終年の本年度は、インフルエンザウイルス、Vaccinia Virus、SARS コロナウイルス、ヘルペスウイルスの6種類を使用した。各サンプルは一部大阪公衛研から分与を受け、電子顕微鏡観察用標準品としてホルマリオンで不活化を行い、ブラインド番号を付けて各地方衛生研究所へ送付した。各衛研では、この4種類のサンプルを電子顕微鏡で観察し報告する。昨年同様、研究班は結果を集計して各地方衛生研究所の評価を行なった。種々の問題点が明らかとなり今後の行政対応指針の資料となった。

[宇田川悦子、小倉 肇 (岡山県環境保健センター)]

(3) 電顕観察用染色液の検討

日立ハイテクノロジーズとの共同研究で、従来使用している酢酸ウラン染色液の代用となりうる染色液の検討を行なった。酢酸ウランは放射能管理規定で厳しく管理されている染色液で通常の検査法としては一般の検査機関等での使用が困難となってきている。このため、同じような染色効果を期待して白金ブルーの検討を行なった。白金ブルーは病理組織の染色液として近年その使用が多用されて来ているので我々も検討を試みたが、残念ながら従来の酢酸ウラン染色やリンタングステン染色法と比較してウイルス粒子の検出効率が悪く実用に耐えられない事が判明した。今後更に別の染色液を検討することとする。

[宇田川悦子]

(4) HCV NS5A 蛋白質と Amphiphysin II の相互作用

HCV の NS5A 蛋白質は細胞内で小胞状膜構造を形成し、その膜上に局在する。Amphiphysin II は脂質二重膜の湾曲度センサーとして機能する蛋白質で、エンドサイトーシスでの小胞形成に関与する。両蛋白質は、NS5A のプロリンが豊富な領域と Amphiphysin 2 の SH3 ドメインで相互作用することが報告されている。この相互作用の生物学的意義について解析を行っている。

[西村順裕、岡本 徹、森石恆司、松浦善治(阪大微研)]

III. 肝炎ウイルスに関する研究

1. A 型肝炎ウイルス (HAV) に関する研究

(1) A 型肝炎ワクチンの接種回数と抗体価の基礎的検討 (継続)

日本で認可されている A 型肝炎ワクチンが2回接種で十分な抗 HAV 抗体を誘導するかどうか、ボランティアを募って検討した。ボランティア数 22 名 (男性 13 名、女性 9 名、年齢 23-56 歳、平均 41.9 歳) について初回と半年後の2回接種を行い、抗体陽転率及び抗体価を測定した。抗体陽転率は 100%、抗体価の平均値は 1866mIU/ml であった。これは通常の3回接種で得られる陽転率、抗体価と同等であり、国産の A 型肝炎ワクチンも外国の A 型肝炎ワクチン同様、2回接種で十分な抗体誘導能を示すことが明らかになった。

[清原知子、佐藤知子、戸塚敦子、米山徹夫、脇田隆字]

(2) 抗 HAV IgM 抗体の in-house ELISA キットとリアルタイム PCR の比較

当室で作製した in-house ELISA キットを用いて臨床検体中の抗 HAV IgM 抗体を測定した。使用した血清 19 検体は同時期に糞便検体も採取されており、リアルタイム PCR によって糞便中の HAV genome のコピー数が明らかになっている。IgM 抗体陽性の血清検体は糞便中の HAV genome が陽性であった。抗体量とコピー数は相関しなかった。これは、HAV が糞便中に排出される時期と抗体が上昇する時期が一致しないためと考えられる。

[清原知子、佐藤知子、米山徹夫]

(3) 臨床検体を使った HAV の RT-LAMP 法の評価

LAMP (Loop-mediated Isothermal Amplification) 法は迅速、廉価で、特別な器械がなくてもアッセイが可能な

ことから、フィールドでの使用が拡大しつつある。臨床検体を使い我々が先に確立した HAV の RT-LAMP 法の評価を行った。臨床検体(糞便 36, 血清 16)を使い、市販の HAV の定量キット (LightCycler を使用した RT-PCR 法) と成績を比較した。その結果、HAV の RT-LAMP 法は市販の RT-PCR 法とほぼ同等の検出感度であったが、定量性に問題があることが示された。

[米山徹夫、下池貴志、清原知子、戸塚敦子、佐藤知子、嶋崎典子 (バイオセーフティ管理室)]

(4) A 型肝炎ウイルス(HAV)産生能の安定した GL37 細胞の確立

GL37 細胞は HAV 増殖に適した AGMK 由来株化細胞であるが、細胞継代歴が 20 数代を超えると HAV 産生速度が低下し、定量結果が一定せず研究にさしつかえる現状であった。この不安定性が細胞培養液中の牛胎児血清ロット差や非動化处理などによるかどうか検討したが、結果が一定せず関係は認められなかった。継代初期に凍結保存した細胞をリカバー時に 8 分割して別々に継代保存した。1 系列のみ継代 40 代まで安定して HAV フォーカスが検出され、今後の研究材料として適することが確かめられた。[戸塚敦子、清原知子、米山徹夫]

(5) 検定試薬の変更 (継続)

A 型肝炎ワクチン 3 ロット、B 型肝炎ワクチン 6 ロットについて現行の標識抗体と新しい標識抗体 (BIOSOURCE AMI4404) を用いて ELISA を行い、OD 値、力価について相関を検討した。全ロットに於いて OD 値の相関係数は 0.9 以上を示し、力価もお互いに 95%信頼限界内であった。この結果を踏まえて今年度中に検定に使用する標識抗体を BIOSOURCE AMI4404 に変更する。[清原知子、佐藤知子、戸塚敦子、米山徹夫]

2. B 型肝炎ウイルス (HBV) に関する研究

(1) HBV と糖鎖の相互作用の解析

HBV 感染の初期過程において細胞表面の多糖類とウイルスとの結合が重要であることが知られているが、エンペロープ蛋白と各糖鎖との相互作用についてはほとんど明らかにされていない。HBV ゲノム遺伝子型 A クローン 1.24 ゲノムコピー長 (4.0 kb) を組み込んだプラスミド

を、ヒト肝癌細胞株 Huh-7 へトランスフェクションすることにより、HBV を持続産生する細胞株を作製した。培養上清を硫酸沈殿により濃縮した後、シヨ糖密度勾配遠心を行い、得られた HBs 抗原分画を用いて、糖鎖アレイ及び糖鎖固定化金ナノ粒子により結合糖鎖を解析している。

[松田麻未、石井孝司、鈴木哲朗、脇田隆字]

(2) B 型肝炎患者のウイルス遺伝子解析

一般に、HBV 遺伝子型 A の感染例では、肝炎の重症化は稀であると考えられている。慈恵医大病院において遺伝子型 A の B 型肝炎で劇症様重症肝炎の経過を示し、抗ウイルス薬非感受性の症例を認めたので、HBV ゲノムの遺伝子解析を行っている。

[相崎英樹、斉藤勝也 (慈恵医大)、松浦知和 (慈恵医大)、鈴木哲朗、脇田隆字]

3. C 型肝炎ウイルス (HCV) に関する研究

(1) E6AP による HCV 粒子産生の制御

コア蛋白のコピキチン依存性分解を調節している E6AP が HCV 粒子産生に及ぼす影響について検討した。E6AP によるコア蛋白量が調節され、HCV 粒子産生を制御する分子機構を詳細に検討している。

[村上恭子、勝二郁夫、福田浩一郎、鈴木哲朗、脇田隆字]

(2) E6AP による HCV コアのコピキチン化部位の解析

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

[勝二郁夫、大崎一直、村上恭子、奈須純一、下地 徹]

(3) HCV genotype と E6AP 依存性コア蛋白分解

HCV コア蛋白は各 genotype 間で高度に保存されている。HCV コアと E6AP の相互作用部位をマッピングしたところ、HCV コアの aa58-71 が重要であることが分かった。さらに詳細に解析したところ、aa58-66 が E6AP と結合するのに必要十分であることが分かった。この領域はすべての genotype で保存されており、実際、E6AP が他の genotype のコア蛋白のコピキチン依存性分解を促進することが

示された。

[大崎一直、勝二郁夫、村上恭子、下地 徹]

(4) HCV core 蛋白と E6AP 結合に対する RNA の影響

HCV コア蛋白はヌクレオカプシド蛋白でウイルスゲノム RNA と結合する。E6AP と HCV コア蛋白の相互作用に対する RNA の影響を解析した。

[大崎一直、勝二郁夫、村上恭子、脇田隆字]

(5) HCV コア蛋白質と結合する新規宿主因子 hnRNP1, H2, F の解析

Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H1(hnRNP H1), hnRNP H2 および hnRNP F を HCV コア蛋白質と結合する新規宿主因子として同定した。HCV コア蛋白質を 293T 細胞にて強制発現し、免疫沈降法によって細胞内でこれらの蛋白質が HCV コアと結合していることを確認した。また、バキュロウイルス発現系にて発現、精製した蛋白質を用いて免疫沈降法および GST-pull down 法により hnRNP1, H2, F と HCV コア蛋白質が直接結合していることを示した。

[阿部克俊、村上恭子、勝二郁夫、大崎一直、高宮智史、市村 徹(防衛大学校)、奈須純一、下地 徹、小池和彦(東大感染症内科)、脇田隆字]

(6) HCV コア蛋白質および hnRNP1, F の結合部位の同定

hnRNP1, F による HCV コア蛋白質の認識機構を明らかにするためにコア蛋白質および hnRNP1, F の各種変異欠損体をバキュロウイルス発現系および大腸菌発現系で発現させた。これらの発現蛋白を用いて GST-pull down 法、免疫沈降法などで結合部位を解析した。hnRNP1, F との結合にはコア蛋白質 1-43aa および 58-111aa の領域が重要であることがわかった。また、core 蛋白質との結合部位は hnRNP1, F の RNA recognition motif (RRM) のひとつが関与していることが示された。

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

(7) HCV コア蛋白質および hnRNP1, F の結合に対する RNA の影響

hnRNP1, F による HCV コア蛋白質の結合部位はそれぞれの RNA 結合領域を含んでいる。このことから、HCV コア蛋白質と hnRNP1, F の結合に RNA が影響する可能性が考えられた。His タグ融合 hnRNP1, F に RNaseA または yeast t-RNA を加えた後、GST 融合 HCV コア蛋白質を加え、GST-pull down 法により検討したところ、RNaseA 処理を行った場合には hnRNP1, F と HCV コア蛋白質の結合が増強され、yeast tRNA を加えた場合には両者の結合が減弱した。以上より、hnRNP1, F と HCV コア蛋白質の結合は蛋白間の直接結合で、両者の結合に RNA が抑制的に作用する可能性が示された。

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

(8) HCV コア蛋白質および hnRNP1, F の結合を阻害する RNA の配列特異性の検討

hnRNP1, F と HCV コア蛋白質の結合に RNA が抑制的に作用している可能性が示唆された。hnRNP1, F に結合する RNA motif については既に報告がある。同様の配列が HCV コア蛋白質の結合部位である HCV-IRES (internal ribosomal entry site) 内 IIIId 領域に存在している。また、HCV IRES IIIId 領域に結合する宿主因子として我々は hnRNP1 を同定しており、hnRNP1, F と HCV コア蛋白質の結合が HCV-RNA により強く阻害される可能性が考えられた。現在、HCV-IRES 領域の RNA および IIIId 領域を欠損した RNA を作製し、hnRNP1, F とコア蛋白質との結合に及ぼす影響を検討している。

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

(9) hnRNP1, F の HCV 複製に及ぼす影響の解析

hnRNP1, F が HCV 複製効率に及ぼす影響について HCV JFH-1 感染系を用いて検討した。pCAG-FLAG-hnRNP1, F を感染細胞に導入した。24-48 時間後の培養上清中の HCV ウイルス産生量を測定した。その結果、hnRNP1, F を発現させた場合、コントロールと比較して培養上清中の HCV 粒子量が有意に減少していた。一方、hnRNP1 を発現させた場合にはコントロールと比較してやや上清中の HCV 粒子量は増加していた。現在 HCV 粒子複製のどの段階に

ウイルス第二部

hnRNPH1, F が影響を及ぼしているか解析している。

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

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

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

[村上恭子、勝二郁夫、阿部克俊、小池和彦(東大感染症内科)、脇田隆字]

(11) 血球系細胞への HCV JFH-1 株感染性の検討

HCV は主に肝細胞で増殖すると考えられているが、肝細胞外、特に血球系細胞への感染および複製を示唆する報告が多くなされている。そこで血球系細胞での HCV JFH-1 の感染の可能性を検討した。Huh7 細胞で産生した HCV JFH-1 感染性粒子を Raji 細胞等様々な血球系株化細胞に加え、0-8 日間培養後、細胞内 HCV コア蛋白質量を定量した。その結果、コントロールとして用いた Huh7 細胞では細胞内 HCV コア蛋白質が有意に増加し、感染および HCV 複製が確認できたのに対し、血球系株化細胞ではいずれの細胞株でも HCV コア蛋白質の増加はみられなかった。

[村上恭子、勝二郁夫、木村敬郎、高宮智史、大崎一直、鈴木哲朗、脇田隆字]

(12) 血球系細胞での HCV JFH-1 RNA 複製の検討

HCV JFH-1 株の subgenomic replicon RNA を各種血球系株化細胞に導入し、day0-day3 の Firefly Luciferase(F-Luci)活性を測定し、HCV-RNA の複製効率について検討した。その結果、Huh7 細胞では day1-3 で

F-Luci 活性が day0 と比較し 100-1000 倍まで増加するのに対して、血球系株化細胞ではいずれの細胞も増加が観察されなかった。これらの結果より、用いた血球系細胞では HCV RNA 複製に必要な宿主因子で欠けているものがあることが示唆された。

[村上恭子、勝二郁夫、脇田隆字]

(13) 血球系細胞での HCV JFH-1 翻訳活性の検討

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

[村上恭子、木村敬郎、大崎一直、勝二郁夫、脇田隆字]

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

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

[村上恭子、木村敬郎、勝二郁夫、石井孝司、脇田隆字]

(15) HCV コア蛋白質の切断部位の検討

HCV コア蛋白質の切断部位については C 末側に宿主の

signal peptidase および signal peptide peptidase によって二カ所切断されることが既に報告されているが、新規プロセシングの可能性を検討した。HCV コア蛋白質のアミノ酸配列中に既知のprotease切断motifがないか検索したところ、アルブミン成熟過程で重要な酵素である furin の切断 motif が5カ所存在した。大腸菌で発現精製した GST-HCV core に furin を加えたところ、core 蛋白質が切断された。また、inhibitor を用いた実験で、感染性粒子の産生量が inhibitor 存在下で減少し、inhibitor を除去すると回復することを確認した。現在、切断部位の同定、HCV 複製および感染過程への影響を解析している。

[村上恭子、勝二郁夫、木村敬郎、大崎一直、脇田隆字]

(16) HCV 粒子形成に關与する新規宿主因子の検索

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

[村上恭子、吉崎佐矢香、松田麻未、勝二郁夫、鈴木哲朗、宮村達男、脇田隆字]

(17) HCV NS3 ヘリカーゼと結合する宿主因子の探索と機能解析

HCV NS3 ヘリカーゼは RNA ヘリカーゼ活性を有し、HCV 複製に重要な役割を果たしている。しかし、その活性制御機構については不明な点が多い。そこで、HCV NS3 ヘリカーゼに結合する宿主因子を分離し、質量分析法で同定した。HCV NS3 ヘリカーゼ結合因子として新規結合因子を8つ同定した。現在、複製に及ぼす影響を解析中である。

[浜本いつき(感染症情報センター)、多屋馨子(感染症情報センター)、岡部信彦(感染症情報センター)、勝二

郁夫、村上恭子、鈴木哲朗、脇田隆字]

(18) TAP 法による HCV 蛋白質結合因子の同定と解析

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

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

(19) HCV 粒子形成に關与する新規宿主因子の検索

HCV Con-1 からなるダイシストロニック HCV RNA を維持した Huh7 細胞を温度感受性ゲルで三次元培養すると HCV 粒子が産生されることから、細胞の三次元化によって発現が変化する宿主因子が HCV 粒子形成に關与していることが考えられる。そこで、二次元培養および三次元培養した細胞をプロテオーム解析し、培養形態によって発現の異なる宿主因子を比較検討した。その結果、脂肪酸結合蛋白質(FABP)などいくつかの蛋白質の発現が三次元培養細胞で有意に増加していることがわかった。この FABP のノックダウンにより培養上清の感染価が約2倍に増加した。また、レプリコンを用いた実験から、RNA 複製への影響はほとんどないことを確認した。

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

(20) HCV 粒子脂質成分のウイルス感染における役割

HCV 感染細胞の培養上清から粗精製した HCV 粒子に含まれる脂質を生化学的に解析した結果、HCV 粒子は細胞膜分画に比べコレステロールに富むことが示された。また、HCV 粒子をコレステロール除去剤あるいはスフィンゴミエリン分解酵素で処理することにより感染性、特に細胞内への侵入効率が顕著に低下することから、HCV 粒子表面上のコレステロール、スフィンゴ脂質が感染初期過程に重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

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

ウイルス第二部

(2 1) HCV 感染における細胞表面脂質の役割

種々のエンベロープウイルスで、標的細胞への結合あるいは融合過程において細胞膜の脂質成分が重要な役割を果たしていることが知られているが、HCV の感染過程における細胞膜脂質の役割についての詳細な報告はない。そこで、HCV 感染における標的細胞表面の脂質の役割を調べている。あらかじめ細胞表面上のコレステロールを除去あるいはスフィンゴ脂質を加水分解しておいた細胞では HCV 感染性は有意に低下した。感染過程における糖脂質の関与についても解析中である。

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

(2 2) コレステロール合成阻害剤による HCV 産生阻害効果の解析

これまで我々は、HCV の生活環の粒子形成、感染、複製などにおいて脂質が重要な役割を果たしていることを示してきた。そこで、HCV 持続感染細胞に各種コレステロール合成阻害剤を添加したところ、血清非存在下において濃度依存的なウイルス産生阻害効果が認められた。これらの薬剤は既に高脂血症治療薬として臨床で使用されているものであり、またウイルス酵素活性等に対する直接的な阻害作用を持たないため耐性ウイルスが出現しにくい可能性がある。既存の抗 HCV 薬との併用により治療効果の向上が期待できる。

[相崎英樹、原 弘道、森川賢一、鈴木哲朗、脇田隆字]

(2 3) HCV、日本脳炎ウイルス(JEV)、水泡性口内炎ウイルス(VSV)におけるウイルス粒子成熟過程の比較解析

エンベロープウイルス粒子は小胞体、ゴルジ体、細胞膜などの生体膜を被り出芽してくるものと考えられが、HCV 粒子の出芽、成熟過程の分子機構は解明されていない。そこで、HCV 粒子と共存する宿主膜蛋白について、近縁ウイルスまた生活環のよく知られているウイルス(JEV、VSV)との比較解析を行った。HCV は、近縁の JEV よりむしろ VSV に類似した、生体膜由来蛋白を含有していた。

[相崎英樹、原 弘道、森川賢一、鈴木哲朗、脇田隆字]

(2 4) 蛋白輸送阻害剤を用いた HCV 粒子成熟化のメカニズム解析

HCV 成熟過程の分子機構を明らかにするため、各細胞内輸送経路に対する種々の阻害剤を HCV 感染細胞に添加し、ウイルス粒子形成、細胞外への分泌に及ぼす影響を解析している。これまでのところ、Nocodazole、Nordihydroguaiaretic acid、Carbonyl cyanide 3-chlorophenylthiohydrazone などによって感染性ウイルスの産生低下が認められた。現在、阻害剤を処理した感染細胞を各膜分画に分離し、それぞれに存在する HCV 粒子の性状と感染性の解析を行っている。

[相崎英樹、原 弘道、鈴木哲朗、脇田隆字]

(2 5) HCV NS3 ヘリカーゼ領域のウイルス複製、ウイルス分泌における役割

HCV の NS3 ヘリカーゼ領域は、ウイルスゲノム複製およびウイルス粒子の分泌に重要である。NS3 ヘリカーゼ領域内のどの部分がこれらの役割を担っているのかを調べるために、JFH-1 株と J6CF 株間の様々なキメラウイルスを作製し HCV RNA 複製、粒子産生を比較した。その結果、JFH-1 株の NS3 ヘリカーゼ領域の N 末端側の領域が効率の良い RNA 複製に重要であり、また、J6CF 株の NS3 ヘリカーゼ領域の N 末端側の領域は効率の良いウイルス粒子の分泌に重要であることが明らかとなった。

[村山麻子、伊達朋子、赤澤大輔、石井孝司、鈴木哲朗、脇田隆字]

(2 6) HCV 粒子形成に関わる NS5A 領域の解析

RNA 複製に影響を与えずに HCV 粒子の形成を制御する NS5A の C 末端領域を同定した。この領域のセリンクラスターを変異させたところ、RNA 複製は変化せずに basal phosphorylation の低下、感染性 HCV 粒子の形成障害が認められた。NS5A C 末端のセリン残基が HCV の粒子形成過程に重要な役割を担うことが示唆された。

[政木隆博、鈴木亮介、宮村達男、鈴木哲朗、脇田隆字]

(2 7) HCV 粒子形成における NS5A/ コア蛋白間相互作用の役割

NS5A とコア蛋白の相互作用を免疫沈降法で明らかに

した。また、NS5A/コア蛋白間相互作用と HCV 粒子形成との間に正の相関性を見出した。免疫細胞染色及び細胞分画解析においても NS5A とコア蛋白の共局在が認められた。以上より、NS5A とコア蛋白の相互作用が粒子形成過程において重要であることが示された。

[政木隆博、鈴木亮介、村上恭子、相崎英樹、石井孝司、宮村達男、鈴木哲朗、脇田隆字]

(2 8) キャプシド形成における NS5A/コア蛋白間相互作用の役割

免疫沈降 RT-PCR 法により NS5A とコア蛋白の相互作用が HCV RNA とコア蛋白の結合に重要であることを見出した。変異体 NS5A の導入により NS5A とコア蛋白の相互作用を障害すると、HCV RNA とコア蛋白の結合が消失した。以上より、新生された HCV RNA と NS5A 複合体へコア蛋白が会合することがキャプシド形成の引き金になる可能性が考えられた。

[政木隆博、鈴木亮介、宮村達男、鈴木哲朗、脇田隆字]

(2 9) HCV 粒子形成におけるコア蛋白塩基性アミノ酸クラスターの役割

HCV コア蛋白のセルフアセンブリー、RNA パッケージングには 3 ヶ所の塩基性アミノ酸クラスター (aa 6-14, 39-44, 59-72) が重要であり、感染性ウイルス産生系の解析から、aa 39-44(CL2)または aa 59-72(CL3)の塩基性アミノ酸をアラニンへ置換することにより粒子産生能が消失することが示された。CL2 または CL3 の変異がコア蛋白と E1、NS5A との相互作用に及ぼす影響を解析中である。

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

(3 0) HCV エンベロープ蛋白質 E1、E2 の結晶化

HCV E1、E2 の結晶化を目指し、N 末端に分泌配列を付加し、更に膜領域を欠失させた分泌型 E1、E2 の発現系を構築した。E1、E2 発現ベクターを 293 細胞に遺伝子導入し一過性発現を解析したところ、E1 は発現量が低かったため、現在、持続発現系の作製を行っている。E2 は高発現し、培養上清中への分泌が認められた。予備的な E2 精製実験を行ったところ高純度(90%以上)の E2 を得た。

大量発現、精製、更に結晶化を行う予定である。

[渡邊則幸、村山麻子、赤澤大輔、朝長充則、伊達朋子、鈴木哲朗、脇田隆字]

(3 1) HCV 粒子侵入過程における E1、E2 糖鎖修飾の役割

レトロウイルスのエンベロープ蛋白質を HCV E1、E2 に置き換えた pseudo-particle を作製して、エンベロープの糖鎖が HCV の侵入過程においてにどのように影響するかを解析する。293 細胞、及び 293GnTI(-)細胞 (主に高マンノース型の糖鎖修飾が行われる) を用いて、異なる糖鎖修飾を受けたエンベロープを含む pseudo-particle を作製した。現在、それぞれの細胞株から放出された pseudo-particle 量の測定系を構築している。

[渡邊則幸、村山麻子、赤澤大輔、朝長充則、伊達朋子、鈴木哲朗、脇田隆字]

(3 2) HCV エンベロープ蛋白と糖鎖の相互作用の解析

HCV E1、E2 がどの糖鎖を認識するかを調べるため、FLAG タグを付加した E1、E2 をそれぞれ発現する細胞株を取得した。得られた細胞株を大量培養し、抗 FLAG 抗体カラムによって E1、E2 をアフィニティ精製した。糖脂質を中心とした 24 種類の糖鎖からなる糖鎖アレイを利用して精製 E2 と糖鎖との相互作用を解析したがこれまでのところ特異的な結合は観察されていない。

[松田麻未、石井孝司、堀内美樹博、鈴木哲朗、脇田隆字]

(3 3) HCV 生活環における小胞体関連蛋白分解 (ERAD) の役割

分泌蛋白や膜蛋白など糖蛋白の多くは、付加されたマンノースのトリミングがシグナルとなりプロテアソーム系で選択的な分解を受ける。種々の糖鎖修飾阻害剤を用いた解析から、マンノシダーゼ活性へ介入することにより HCV 産生レベルが変動することを見出しており、HCV 粒子産生過程に ERAD 経路が関与する可能性を考えた。更に siRNA 解析から、ERAD 関連分子のうち EDEM family が HCV 産生調節に関わることが示唆された。

[Saeed Mohsan、政木隆博、鈴木哲朗、渡邊治雄、脇田隆字]

(34) HCV 遺伝子型に特徴的な RNA 複製メカニズムの解析

HCV 遺伝子型 1b では、脂質ラフトが存在する生体膜上で複製複合体が形成され、ウイルス RNA 複製が行われていることを報告している。一方、遺伝子型 2a (JFH-1) では、脂質ラフト形成を阻害するスフィンゴ脂質合成阻害剤によって RNA 複製の低下は認められなかった。RNA 複製におけるスフィンゴ脂質要求性が HCV 遺伝子型間あるいは株間で異なる可能性を考え、遺伝子型 1b 及び 2a 由来 HCV レプリコンの比較解析を進めている。

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

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

HCV RNA 複製に必要な宿主因子を同定し複製メカニズムを明らかにするため、HCV レプリコン細胞と Huh7 細胞から界面活性剤不溶性画分を、ウイルス複製活性を維持したまま粗精製し、蛍光標識二次元ディファレンスゲル電気泳動法により各蛋白の量的比較を行った。複製複合体画分で顕著に増加していた蛋白群を選択し、siRNA による loss-of-function screening を行った。Hsc70, cathepsin D, creatine kinase B (CKB) 等に対する siRNA において、サブゲノムレプリコンの RNA 複製が 50%以下まで低下した。これらのうち CKB および TRiC/CCT に注目して HCV 複製における役割を解析中である。

[相崎英樹、松田麻未、原 弘道、井上 寧、宮村達男、鈴木哲朗、脇田隆字]

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

HCV 複製複合体画分に含まれる宿主因子として 8 種類のサブユニットからなる分子シャペロン CCT/TRiC の subunit 2, 3, 5 が同定され、さらにレプリコン細胞における高複製期と低複製期の比較解析から、HCV ゲノム複製機構に関与する宿主蛋白として CCT subunit 5 が同定された。強制発現、ノックダウン解析から CCT/TRiC が HCV RNA 複製を正に調節すること、免疫沈降-ウエスタ

ンプロット解析から、NS5B 蛋白は aa 71-591 領域を介して CCT/TRiC と相互作用することが見出された。更に、Cell Free 複製系において HCV 複製能が抗 TRiC 抗体によって阻害されることが示された。CCT/TRiC は NS5B のフォールディング介助などに働くことによって HCV 複製調節に関与する可能性が考えられる。

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

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

HCV 複製複合体を構成する宿主因子として、細胞内の ATP 輸送、ATP/ADP 濃度調節に働く CKB を同定した。遺伝子型 1b 及び 2a 由来の HCV レプリコン細胞において、CKB 遺伝子のノックダウン、dominant negative CKB の強制発現あるいは CKB 阻害剤 cyclocreatine 処理により HCV RNA 複製の有意な抑制が観察され CKB が HCV RNA 複製調節に関与することが明らかとなった。さらに、セミインタクト細胞を用いた HCV replicase アッセイ系において、CKB 添加により HCV 複製が亢進されることを見出した。

[原 弘道、相崎英樹、松田麻未、井上 寧、勝二郁夫、鈴木哲朗、脇田隆字]

(38) CKB と HCV 非構造蛋白との相互作用

エピトープタグを付加した NS3、NS4A、NS4B、NS5A、NS5B をそれぞれ発現させた細胞を用いた免疫沈降 / ウエスタンプロット解析により、CKB は NS4A 蛋白と相互作用することが見出された。この相互作用に関わる CKB、NS4A 領域を同定した。また、NS4A 結合部位の欠損により CKB の複製への影響が低下することから、CKB-NS4A 相互作用が HCV RNA 複製に重要であることが示された。

[原 弘道、相崎英樹、松田麻未、井上 寧、勝二郁夫、鈴木哲朗、脇田隆字]

(39) CKB が HCV NS3 酵素活性へ及ぼす影響

NS4A は NS3 と結合し、NS3 酵素活性の補因子として働く。そこで、CKB が NS4A との結合を介して NS3 のプロテアーゼまたはヘリカーゼの活性に影響を及ぼすかどうかを検討した。精製 NS3-4A, CKB を用いたアッセイ系によ

る解析で、CKB は NS3 セリンプロテアーゼ活性に影響しない反面、NS3 ヘリカーゼ活性を亢進させた。CKB は、NS3 ヘリカーゼ活性を高めることにより HCV 複製調節に働く可能性が示された。

[原 弘道、相崎英樹、松田麻未、井上 寧、勝二郁夫、鈴木哲朗、脇田隆字]

(4 0) HCV RNA 複製における protein phosphatase 2Cε (PP2Cε) の役割

HCV のゲノム複製、粒子産生が NS5A のリン酸化によって制御される可能性が考えられる。PP2Cεが HCV RNA 複製に及ぼす影響を HCV JFH-1 株(遺伝子型 2a) の subgenomic reporter replicon を用いて解析した。PP2Cεの過剰発現により HCV RNA 複製が約 1/2 に低下した(48 時間後)。今後は PP2Cεの過剰発現、knock down が NS5A のリン酸化、HCV 粒子産生に与える影響を解析する予定である。

[政木隆博、花田賢太郎(細胞化学部)、鈴木哲朗、脇田隆字]

(4 1) 感染性ウイルス粒子を分泌する HCV 全長遺伝子レプリコン細胞の樹立

HCV JFH-1 株の全長遺伝子の上位にネオマイシン耐性遺伝子を挿入することにより全長 HCV 遺伝子を持つレプリコンを樹立した。レプリコン遺伝子を Huh7 細胞に導入し、G418 による薬剤選択培養を行うことにより、レプリコン複製細胞を樹立した。この細胞では 230 日の長期培養でも全長遺伝子の維持が可能であり、その培養上清を naïve な Huh7 細胞へ添加することにより、本細胞株から感染性 HCV が産生されることが示された。

[伊達朋子、宮本道子(東京都医学研究機構)、加藤孝宣(東芝病院)、森川賢一、村山麻子、赤澤大輔、田邊純一(東レ医薬研)、曾根三郎(東レ医薬研)、溝上雅史(名古屋市立大)、脇田隆字]

(4 2) ヒト肝由来培養細胞における感染性 HCV 粒子の作製

Huh7 以外の培養細胞での感染性 HCV の作製を試み、HepG2 および IMY-N9 細胞に JFH-1 全長レプリコン RNA を導入したレプリコン細胞を作製した。これらのレプリコン細胞の培養上清は naïve Huh7 細胞に対して感染性を示

した。培養上清をシヨ糖密度勾配で分画したところ、Huh7 由来の粒子性状と異なるプロファイルを示した。異なる培養細胞で作製された HCV 粒子は、異なる性状を有する可能性がある。

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

(4 3) ヒト肝外および非ヒト由来培養細胞における感染性 HCV 粒子の作製

ワクチン開発に有利と考えられる、ヒト肝外および非ヒト由来の培養細胞での感染性 HCV の作製を試みている。J6/JFH1 キメラ全長レプリコン RNA を導入したレプリコン細胞を作製し、その培養上清に感染性 HCV が分泌されるか否かを調べたところ、HeLa(ヒト子宮頸癌) および NIH3T3(マウス胎児皮膚) 細胞で全長レプリコン細胞が樹立された。しかしながら、その培養上清の naïve Huh7 細胞に対しての感染性は確認できていない。今後、他の培養細胞株を用いて検討を行う。

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

(4 4) Pol I システムを用いた感染性 HCV 粒子の作製と HCV 粒子持続産生細胞株の樹立

HCV 全長の cDNA を RNA polymerase I (Pol I) プロモーター/ターミネーター間に挿入したプラスミドをヒト肝臓由来細胞に導入することにより、HCV RNA が複製しウイルス粒子が産生されることを見出した。また、このプラスミドにゼオシン耐性遺伝子を導入し HCV 粒子持続産生細胞株を樹立した。この細胞株は抗 HCV 効果を有する薬剤のスクリーニングに有用であった。

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

(4 5) HCV 遺伝子型 1b の構造蛋白を持つキメラウイルスの作製

HCV JFH-1 ゲノムの構造蛋白質領域を遺伝子型 1b TH 株に置き換えたキメラウイルス遺伝子を構築し、Huh7 細胞に導入して感染性 HCV を作製した。感染複製細胞の継

代培養を続け、HCV 産生レベルが上昇した時点の遺伝子解析を行ったところアミノ酸置換変異が認められた。この変異を野生型キメラ遺伝子に導入して、ウイルス複製、分泌、感染力価を測定した。この変異は野生型キメラウイルスと比較してウイルス分泌を上昇させる適応変異であり、感染力価には影響を及ぼさなかった。

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

(46) HCV の遺伝子型 2b/2a 間でのキメラウイルスの長期培養の解析

HCV の遺伝子型 2b/2a 間で作製したキメラ遺伝子を培養細胞に導入し、長期培養した結果、ある時点でウイルスの分泌量、培養上清の感染性ともに、急激に上昇した。また、ウイルス感染の広がるスピードも培養開始直後と比べると急激に早くなっていた。長期培養により導入されたウイルスゲノムの変異を調べた結果、同時に行った4系列の培養細胞から様々な変異が見つかったが、1カ所だけ、共通した変異が存在した。

[村山麻子、伊達朋子、赤澤大輔、石井孝司、鈴木哲朗、脇田隆字]

(47) HCV の遺伝子型 2b/2a キメラウイルスの長期培養により導入された適合変異の解析

HCV の遺伝子型 2b/2a 間で作製したキメラ遺伝子を培養細胞に導入し、4系列の細胞を長期培養した結果、コア蛋白質コード領域に1カ所の共通した変異が存在した。この変異を導入したウイルスゲノム RNA を作製し、培養細胞に導入したところ、変異がある場合は、感染性ウイルス粒子の培養上清中への分泌効率が上昇していた。しかし、ウイルスゲノムの複製能に変化はなかった。

[村山麻子、伊達朋子、赤澤大輔、石井孝司、鈴木哲朗、脇田隆字]

(48) HCV レプリコン保持細胞での HCV 構造領域の発現とウイルス様粒子 (HCV-LP) 形成

HCV RNA レプリコンを持つ Huh7 細胞に HCV の構造蛋白領域を発現させることで、レプリコンを粒子中に保持する HCV-LP が形成されるかを検討した。JFH-1 株のサブゲ

ノムレプリコン細胞に JFH-1 の構造領域を発現するプラスミドを導入し、薬剤選択により恒常的に構造蛋白を発現する細胞株を樹立した。培養上清をシヨ糖密度勾配で分画したところ、構造蛋白、HCV レプリコン RNA は同一の画分に存在し、この画分を電顕観察したところ HCV 粒子とほぼ同じ直径 50nm 程度の粒子が多数観察された。

[石井孝司、張 斌、李 津、鈴木亮介、鈴木哲朗、脇田隆字]

(49) HCV-LP の感染性の検討

前項のように作製した HCV-LP が感染性を有する場合、感染後、細胞中にレプリコン RNA が導入され、レプリコン上の薬剤耐性遺伝子が細胞中で発現するため、感染細胞は薬剤耐性を獲得する。シヨ糖密度勾配で得られた HCV-LP 画分を naive な Huh7 細胞に感染させ、G418 存在下で3週間培養したところ、薬剤耐性コロニーが多数得られ、HCV-LP に感染性があることが証明された。また、感染後の細胞を抗 NS5A 抗体で染色したところ陽性細胞が多数見られ、この結果からも HCV-LP の感染性が証明された。今後は他の genotype のクローンでも同様に感染性の HCV-LP が形成されるかどうかを検討する。

[石井孝司、村上恭子、Su-Su Hmwe、鈴木亮介、鈴木哲朗、脇田隆字]

(50) 培養細胞で作製した感染性 HCV 粒子の構造解析

HCV 粒子の形態解析は、ウイルス産生効率の低さなどのため、必ずしも十分に進んでいない。今回、低濃度の NP-40 で HCV 粒子サンプルを前処理した後、電子顕微鏡解析したところ、従来法に比べ、HCV 粒子と共在する分泌蛋白質、脂質等の夾雑物を除去できることが見出された。HCV 粒子構造の詳細な解析が可能となった。

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

(51) 患者血清中の HCV 粒子の性状解析

HCV 感染患者血清中の HCV 粒子を、シヨ糖密度勾配超遠心法によって分画し、HCV RNA、コア蛋白量をそれぞれ RT-PCR 法、ELISA 法にて測定した。患者血清中には様々な比重の HCV が存在する事が示された。また血清中の HCV

RNA とコア蛋白の密度分布が必ずしも一致しない患者が存在することが明らかとなった。

[森川賢一、伊達朋子、赤澤大輔、村山麻子、脇田隆字]

(52) 患者血清中の HCV 粒子の感染性の検討

HCV 感染患者血清中の HCV 粒子を蔗糖密度勾配超遠心で分画し、比重 1.16g/ml 付近の分画と比重 1.06g/ml 付近の分画に存在するウイルスに分離した。異なった比重のウイルスをそれぞれ人肝細胞キメラマウスへ接種し感染性が異なるかを検討中である。

[森川賢一、伊達朋子、赤澤大輔、村山麻子、脇田隆字、今村道夫(広島大)、茶山一彰(広島大)]

(53) JFH-1 患者血清感染チンパンジーおよびヒト肝臓キメラマウスで増殖した HCV の遺伝子解析

培養細胞で効率よく増殖可能な JFH-1 株を分離した患者血清をチンパンジー およびヒト肝細胞キメラマウスに感染させた。チンパンジーでは一過性に感染が成立した。また、ヒト肝細胞キメラマウスでは持続的に感染が成立した。チンパンジーおよびマウス血清からウイルスゲノムを分離してその遺伝子配列を解析し、同定したアミノ酸変異の感染増殖に与える影響を検討している。

[Saeed Mohsan、伊達朋子、加藤孝宣(東芝病院)、Liang T Jake(米国 NIH)、田中靖人(名古屋市大)、溝上雅史(名古屋市大)]

(54) HCV J6/JFH1 株によるワクチン開発

Huh-7 細胞にて産生した HCV J6/JFH1 株を精製しマウスへ腹腔内投与することにより、HCV E1、E2 に対する抗体誘導が認められた。この免疫マウスの血清が HCV 感染阻害能を有することを、Huh-7 細胞への HCV 感染評価系によって明らかにした。ワクチン開発へ向け、ウイルス粒子の大量産生、精製法の最適化を検討中である。

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

(55) JFH1 株 HCV 免疫マウスによるモノクローナル抗体の作製

Huh-7 細胞にて産生した JFH1 株 HCV を精製した。5 週

齢雌・BALB/c マウスに精製 HCV を FCA と懸濁したものの、2,4,6 週後に同量の HCV を FIA と懸濁したものを腹腔内へ投与した。6 ヶ月後に同量の HCV を追加免疫したマウスを用いてモノクローナル抗体を作製した。得られたモノクローナル抗体のうち HCV エンベロープ蛋白質を認識する抗体により、JFH1 株及び他のキメラ HCV の Huh-7 細胞への感染を抑制できることを見出した。

[尾見法昭、森川賢一、赤澤大輔、高橋 仁、鈴木哲朗、石井孝司、脇田隆字]

(56) エピトープタグを付加した組換え HCV 粒子高産生系の構築

前年度報告により、HCV J6/JFH-1 遺伝子の E2 HVR1 領域に FLAG タグ配列を挿入した組換え HCV 粒子の作製を試みる過程で、HCV 粒子産生を増強していると期待される適応変異(E2 領域の糖鎖結合部位の一つであるアスパラギンがリジンに置換)の存在が確認された。この変異を導入したエピトープタグ付加 J6/JFH-1 遺伝子を作製し、細胞内に導入したところ、変異を導入していないものに比べ、HCV 粒子産生および感染力価が増強していることが示された。

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

(57) エピトープタグを付加した組換え HCV 粒子の精製

HCV 粒子を高産生に維持する適応変異を導入したエピトープタグ付加 J6/JFH-1 遺伝子を用いて、HCV 粒子の精製を試みた。上記 HCV 粒子含有培養上清に -FLAG(M2) アガロースを添加し、アフィニティ精製を行った。3 × FLAG ペプチドを用いて HCV 粒子を溶出後、精製 HCV 粒子の超遠心濃縮を行った。この精製濃縮 HCV 粒子の回収効率および感染性を検討したところ、約 10% の HCV 粒子が回収され、この HCV 粒子は高い感染力価を有することが示された。

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

(58) 精製組換え HCV 粒子の性状解析

アフィニティ精製した HCV 粒子の純度を調べるため、

SDS-PAGE を行い、銀染色を行った。その結果、精製サンプルではほとんど夾雑蛋白質は確認されず、高純度の HCV 粒子が精製されたことが示された。この精製 HCV をネガティブ染色後、透過型電子顕微鏡観察を行ったところ、直径 50 nm 程度の粒子構造が観察され夾雑物がほとんど存在しないことが示された。さらに、精製粒子にアソシエートする細胞蛋白質を質量分析法により解析したところ、Fatty acid synthase と Fibrinogen が同定された。

[高橋 仁、尾見法昭、赤澤大輔、松田麻未、中村紀子（東レ医薬研） 望月英典（東レ医薬研） 田中恵子（感染病理部） 佐多徹太郎（感染病理部） 鈴木哲朗、脇田隆字]

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

これまで全ての非構造蛋白 (NS2-5B) を発現するトランスジェニックマウスはウイルス蛋白の発現レベルが低く病態解析が困難であった。そこで、NS3/4A および 5A 蛋白をそれぞれ発現するトランスジェニックマウスの作製を試みた。現在、トランスジェニックマウスの表現型の変化を観察中である。一方、臨床学的知見から、コア蛋白の aa 70、91 がインターフェロン療法の治療効果に影響することが報告されており、これらのアミノ酸を変異させたコア蛋白発現トランスジェニックマウスの作製も行っている。

[相崎英樹、小池和彦（東京大）、宮村達男、鈴木哲朗、脇田隆字]

(60) HCV 感染に伴う経時的な遺伝子発現の解析

HCV JFH-1 感染細胞の遺伝子発現変化を cDNA マイクロアレイ法で経時的に解析し HCV 感染によって有意に発現変動の見られる宿主細胞遺伝子群を同定した。特に発現変化の顕著であった CD19 について HCV 感染に与える影響を調べるため、HCV 持続感染細胞において siRNA で CD19 の発現を抑制したところ HCV の産生量が低下した。CD19 の HCV 増殖における役割について解析している。

[相崎英樹、各務伸一（愛知医大）、脇田隆字]

(61) コア蛋白発現細胞のミトコンドリア蛋白のプロ

テオーム解析

ミトコンドリア蛋白のプロテオーム解析から、chaperone として働き細胞増殖調節にも関与する prohibitin の蛋白レベルが、HCV コア蛋白の発現によって亢進すること、コア蛋白は prohibitin の N 末端領域と結合し prohibitin の安定化に寄与する可能性が示された。コア蛋白、prohibitin の細胞内局在を調べたところ、両蛋白の一部はミトコンドリアで共局在することが示された。

[相崎英樹、堤 武也（東京大） 小池和彦（東京大） 宮村達男、鈴木哲朗、脇田隆字]

(62) C 型肝炎治療薬リバビリンに対する抵抗性 HCV の解析

HCV JFH-1 レプリコン細胞へのリバビリン長期添加により、リバビリン抵抗性の遺伝子型 2a HCV を見出した。この抵抗性 HCV が有する遺伝子変異のうち NS5B 領域 aa 2471 のチロシンからヒスチジンへの変異が HCV JFH-1 株のリバビリン抵抗性獲得に寄与する可能性が示された。aa 2471 は遺伝子型特異的な残基を有しており、2a 型ではチロシンが 1a/1b 型ではヒスチジンがよく保存されている。一般に、リバビリンは HCV 2a 型より 1 型に対して治療効果が低いとされているが、aa 2471 残基の違いに起因しているのかもしれない。

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

(63) HCV 持続感染細胞系を用いた抗 HCV 薬耐性ウイルスの解析

様々な作用機序を有する抗 HCV 化合物を HCV JFH-1 持続感染細胞に長期間添加することによって出現する薬剤耐性ウイルスの解析を行っている。NS3 プロテアーゼ阻害剤 BILN2061 (100 nM) によって感染細胞中の HCV RNA レベルは 1/100 以下まで低下するが、添加開始 1 ヶ月後からウイルス産生の上昇が認められ 3 ヶ月後では非処理細胞と同等のウイルス産生レベルまで回復した。この細胞中の HCV 遺伝子を解析したところ、NS3 領域に 2 ヶ所、NS5B に 1 ヶ所アミノ酸変異が認められた。

[鈴木哲朗、Su-Su Hmwe、松田麻未、脇田隆字]

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

立体構造を持つ RNA に結合するペプチドを効率よくスクリーニングする方法 (KAN システム) を利用して、HCV RNA 結合ペプチドを大腸菌内でスクリーニングした。その結果、HCV の 3' UTR ステムループ構造に強く結合するペプチドが 3 種類見出された。そこで、HCV レプリコン RNA にこれらのペプチドを添加し RNA-ペプチド複合体を形成させ肝細胞中に導入し、ペプチドのウイルス複製阻害効果を評価した。その結果、同ペプチドはウイルス複製を抑制しなかった。現在、HCV のループ・ループ相互作用を阻害することによりウイルスの複製を抑制できるかを検討中である。

[塩沢綾子、相崎英樹、鎌田麻利江、石井孝司、原田和雄 (東京学芸大)、鈴木哲朗、脇田隆字]

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

Huh-7.5.1 細胞に HCV J6/JFH-1 株を感染させ、培養上清中に放出された HCV コア蛋白量を測定する方法により、阻害剤の評価が可能な安定したアッセイ系を構築した。この評価系を用い、低分子阻害剤のスクリーニングを実施予定である。

[朝長充則、伊達朋子、赤澤大輔、村山麻子、渡邊則幸、鈴木哲朗、脇田隆字]

(66) HCV コア抗原パネルの作製及びコア抗原検出試薬の評価

種々の HCV 遺伝子型 (1a, 1b, 2a, 2b, 3a) 由来コア抗原を現行の診断キット (EIA、蛍光 EIA) で測定したところ、蛍光 EIA 法において遺伝子型 2a (JFH-1) コア抗原の検出感度が他に比べ顕著に低いことが見出された。診断キットに使われた抗体のエピトープ配列から検出感度に影響しうるアミノ酸残基を推定し、それらを各々導入したコア蛋白変異体を作製し解析した結果、遺伝子型間 (クローン間) の検出感度の差異に関与するアミノ酸残基が同定された。

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

(67) GBV-B 慢性感染モデルの確立

チンパンジーに代わる霊長類サロゲートモデルの開発を目標とし、HCV に最も近縁な GBV-B を用いて新世界ザルへの感染実験を行っている。通常、サルへの GBV-B 感染においては、二ヶ月程度のウイルス血症に伴う急性肝炎を呈した後寛解し、ウイルスは排除されると考えられている。しかしながら急性感染期後の個体を 2 年以上に渡って長期観察し潜伏感染の有無を検討したところ、9 頭中 7 頭から間欠的に血中ウイルス RNA が検出された。GBV-B は HCV と同様にサル個体において急性期以降も検出限界以下のレベルで長期潜伏感染し、何らかの原因で間欠的にウイルス増殖が再活性化されることが明らかとなった。

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

(68) 肝炎情報の収集とデータベース構築及び情報発信

我が国における肝炎ウイルス感染の予防、肝炎ウイルスキャリア対策、肝癌死亡の減少に貢献することを目的として、肝炎診療をめぐる国内、海外の情報等の収集とデータベース構築、およびインターネット等による情報の提供をめざし、ホームページを立ち上げた。また、マスコミや医療機関に配られる雑誌で最近の肝炎をめぐる社会情勢を報告し、海外の雑誌に C 型肝炎の基礎的な情報を発表した。

[相崎英樹、田中純子 (広島大)、吉澤浩司 (広島大)、脇田隆字]

(69) HCV IRES は PKR の自己リン酸化を誘導するが、それによる翻訳は eIF2 のリン酸化耐性である

HCV IRES は PKR の自己リン酸化を誘導した。In vitro 翻訳系で HCV IRES により PKR は自己リン酸化され cap 依存的翻訳は抑制された。しかし HCV IRES 依存的翻訳は抑制されなかった。このときリン酸化された PKR の量依存的に eIF2 のリン酸化が増加することを明らかにした。HCV IRES 依存的翻訳は翻訳開始宿主因子 eIF2 が不要な新たな翻訳開始機構が示唆される。

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

4. E型肝炎ウイルス(HEV)に関する研究

(1) 環境水からのE型肝炎ウイルス(HEV)遺伝子の検出
ブタはHEVのリザーバーであることが明らかになっている。HEVの汚染が動物から自然環境へ拡散しているか否かを検証する目的で、養豚場の周辺にある河川水からのHEV RNA検出を試みた。日本中部地域にある河川水を採取し、濃縮した後、RNAを抽出し、RT-PCR法でHEV RNAの増幅を行い、増幅産物を直接塩基配列解析、あるいはクローニング後塩基配列解析を行った。同じ河の3つの異なる場所から採取した河川水からHEV RNAが検出された。塩基配列を解析した結果、河川水から分離したHEV RNAの配列はその付近にある養豚場のブタから分離した株の配列と類似しているが、完全一致ではない。この結果は河川水のHEVの汚染はどこの養豚場から由来したかを同定できなかったが、下水の処理不十分な養豚下水が汚染源となる可能性を示唆した。

[李 天成、宮村達男、脇田隆字、武田直和]

(2) 免疫不全症モデルマウス(TSN KO)におけるE型肝炎ウイルス(HEV)の感受性

Translin 遺伝子を欠損した免疫不全症モデルマウス(TSN KO)では、末梢血リンパの著しい減少が幼年期に観察され、コロナウイルス感染に対する抵抗性が有意に低下していることが明らかになっている。また、生後10ヶ月を経たTSN KOが骨髄不全症を発症する。HEVをTSN KOマウスに接種し、経時的に採血、採便を行いELISA法、RT-PCRを用いキメラマウスの血液、糞便中からウイルス抗原およびウイルスRNAを検出した。その結果、ウイルス抗原もウイルスRNAも検出されず、HEVがTSN KOマウスに感染して増殖することが認められなかった。

[李 天成、武田直和、宮村達男、葛西正孝(免疫部)]

(3) C57BL/6マウスにおけるE型肝炎ウイルス(HEV)の感受性

多種の野生動物が抗HEV抗体を有すると報告されながらその特異性の証明が困難である。本実験ではG1, G3, G4 HEVをそれぞれC57BL/6マウスに接種し、経時的に採

血、採便を行いELISA法、RT-PCRを用いラマウスの血液、糞便中からウイルス抗原およびウイルスRNAの検出を行い、ウイルスの増殖の有無によってHEVに対する感受性を検討した。その結果、ウイルス抗原もウイルスRNAも検出されず、接種したHEVがマウス体内で増殖していないことが明らかになった。つまり、マウスはHEVに対する感受性がないことが示唆された。

[李 天成、宮村達男、脇田隆字、武田直和]

(4) キメラマウスにおけるE型肝炎ウイルス(HEV)の複製

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

[李 天成、宮村達男、脇田隆字、武田直和]

(5) 培養細胞におけるE型肝炎ウイルス(HEV)の増殖

HEVは増殖のための確実な細胞培養系が未だに樹立されていないウイルスである。細胞培養系はウイルスの複製、増殖、感染のメカニズムの解明にはどうしても欠かせない手法である。我々は遺伝子型の異なる複数のHEV株をそれぞれPLC/PRF/5, A549, GL37などの細胞に接種し、経時的に培養上清中のHEV RNA, HEV 抗原をRT-PCR, ELISA法にて測定し、HEVの増殖できる細胞、あるいはこれらの細胞で増殖できるウイルス株を検索した。PLC/PRF/5細胞で増殖されたウイルスをカニクイザルに静脈接種し、ウイルスがサル体内で増幅することが確認された。現在、PLC/PRF/5に感染したウイルス株の性状および感染力の変化の有無を解析している。

[李 天成、宮村達男、脇田隆字、武田直和]

(6) HEV のレプリコン構築と肝癌由来培養細胞での複製

ヒト肝癌由来培養細胞で増殖することが見出された HEV クローンの全長 cDNA を構築し、その構造蛋白領域をネオマイシン耐性遺伝子に置換したサブジェノミックレプリコンを作成した。この cDNA をテンプレートとして RNA を合成し、肝癌由来培養細胞株にエレクトロポレーションにより導入し、ネオマイシン存在下で3週間培養したところ薬剤耐性細胞のコロニーが多数生じた。この結果より、全長 cDNA の非構造領域は正常に機能していると考えられる。このレプリコン細胞株を用いて HEV の複製機構の解析を進める。

[石井孝司、李 天成、吉崎佐矢香、脇田隆字、武田直和]

(7) HEV 非構造蛋白のプロセシングの解析

HEV の非構造蛋白をコードする ORF1 のプロセシング解析を行うため、in vitro translation 法により ORF1 の全長蛋白および C 末側を欠損させた変異体蛋白の発現を試みた。全長蛋白と様々な分子量の蛋白の発現が検出されたので、Western blot 法や免疫沈降法により領域の同定を試みたが、現在まで一部しか同定できていない。さらに、2 価イオンの添加や、プロテアーゼの活性中心と予想される部位への変異導入によるプロテアーゼ不活性化を試みたが、発現やプロセシングに変化は見られなかった。現在、培養細胞での増殖が確認されたクローンを用いて同様の手法による解析を行っている。

[吉崎佐矢香、石井孝司、李 天成、武田直和、鈴木哲朗、脇田隆字]

(8) HEV 非構造蛋白の大腸菌による発現

Genotype3 の非構造蛋白に対する抗体作成のため、大腸菌を用いて抗原タンパクの発現を試みた。T7 プロモーターの下流に ORF1 の各領域(5 種類)をサブクローニングして、His タグとの fusion 蛋白として発現させた。プロテアーゼ、ヘリケース、ポリメラーゼ領域の発現が確認できた。そのうち可溶化条件の決定したヘリケース領域は蛋白の大量発現、精製を行い、ウサギに免疫し抗血清を得た。現在、他の領域の発現検討および抗血清の精製の検討を行っている。

[吉崎佐矢香、石井孝司、李 天成、武田直和、鈴木哲朗、脇田隆字]

IV. 腫瘍ウイルスに関する研究

1. ヒト乳頭腫ウイルス(HPV)に関する研究

(1) HPV16E6 蛋白と結合する宿主因子 E6AP の新規標的蛋白の検索

HPV16E6 蛋白と結合する宿主因子 E6AP はユビキチンリガーゼ活性を有し、p53, hDgI, hScribなどをユビキチン化し、分解する。E6AP は単独でもユビキチンリガーゼ活性を有しており、細胞内蛋白の安定性調節に関与している。新規 E6AP 結合蛋白として PRDX1 を同定した。E6AP の強制発現により PRDX1 発現量が低下することを明らかにした。現在、PRDX1 と E6AP の結合様式に関する詳細な検討を行っている。

[奈須純一、勝二郁夫、村上恭子、鈴木哲朗、佐藤多鶴子(日本歯科大学)]

(2) E6AP による annexin A1 の機能調節

子宮頸癌細胞株 C33A 細胞から GST-pull down 法により、E6AP 新規結合蛋白として annexin A1 を同定した。E6AP は annexin A1 を Ca²⁺依存性に結合、およびユビキチン化することを明らかにした。E6AP の強制発現により annexin A1 タンパク量は著明に減少し、内在性 E6AP の siRNA による knock-down で annexin A1 タンパク量が増加することから、細胞内の annexin A1 の安定性は E6AP により制御されていることが明らかとなった。また、AnnexinA1 内の E6AP 結合部位について同定を行った。

[下地 徹、村上恭子、勝二郁夫、松田麻未]

V. その他の研究

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

離乳後多臓器発育不良症候群(PMWS)は、衰弱、呼吸困難、リンパ節腫脹、下痢、黄疸など様々な臨床症状を呈し発育不良となる豚の消耗性症候群である。その主な病原因子の一つとして PCV2 の関与が指摘されている。PCV2 は、日本国内に広く浸潤しており、PMWS 防止対策として PCV2 ワクチンの開発が重要であると考えられる。

ウイルス第二部

PCV2のORF2をHEV-ORF 2のN末端に挿入し、組換えバキュロウイルス発現システムを用いて、PCV2-ORF2とHEV-ORF 2の融合蛋白を大量に発現し、培養上清および感染細胞から目的蛋白を精製し、電子顕微鏡で粒子の形成を観察した。その結果、N末端に下記の6つのPCV2構造蛋白領域を連結した組換えバキュロウイルスで感染したTn5昆虫細胞及びその培養上清から直径23-24nmの粒子が多数観察された。キメラ粒子の抗原性と免疫原性の解析が進行中である。

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

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

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

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

(3) 日本におけるイノシシが保有するPCV2の遺伝子特徴調査

組換えバキュロウイルス発現系で作製したVLPsを抗原として抗体検出ELISAを開発し血清疫学調査をおこなった結果、日本に生息している野生イノシシにおける抗PCV2抗体保有率が50%であることが明らかになった。さらに一部の検体からPCR法を用いてPCV2遺伝子も検出さ

れた。これまで日本のブタから分離されるPCV2全長配列が少なく、イノシシから分離されたPCV2の全長配列がまだない。これらの陽性サンプルの全長遺伝子を増幅し、その配列を解析している。

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

(4) デングウイルス1型の感染性クローンの樹立とNS1変異体の機能解析

ブラジルで1990年に流行したデングウイルス1型 (BR-90) の感染性クローンをBacterial artificial chromosomeプラスミドを利用して樹立した。さらにこのクローンを用いて、NS1温度感受性変異体の解析を行い、この変異がゲノムの複製に影響する事を明らかにした。[鈴木亮介、Peter W. Mason (テキサス大)]

(5) ウエストナイルウイルスにおける複製効率の良い変異型Cyclization sequence (CS) の同定とその応用

フラビウイルスにはウイルスゲノムの両末端に高度に保存されたCSを有し、この配列がウイルスゲノムの複製に重要である事がわかっている。この領域に網羅的に変異を導入し、野生型の複製効率を維持した変異CS配列を同定した。この変異型CSを片側の末端のみに導入するとウイルスの複製が認められない事から、野生型との組み替えウイルスの増殖は抑制される事が示唆された。安全性の高いワクチンの開発に繋がる可能性が考えられる。[鈴木亮介、Peter W. Mason (テキサス大)]

(6) キメラシュードフラビウイルスを用いたデングウイルス2型ワクチンの開発

Capsid 遺伝子の大部分を欠損したウエストナイルウイルスを用い、デングウイルス2型のprMおよびE遺伝子を持つキメラシュードウイルスを作製した。これを継代し、複製効率が向上する変異を獲得した後、Capsid蛋白発現細胞を用いて大量のシュードウイルスを調製した。ワクチンの効果を評価するため、インターフェロンレセプターK0マウスを用いた動物実験が進行中である。[鈴木亮介、Peter W. Mason (テキサス大)]

(7) 温度感応性高分子TGPを用いた三次元培養ヒト肝

ウイルス第二部

癌細胞における細胞接着因子の発現解析

Huh7 細胞は TGP 培養系において、立体的なスフェロイド構造を形成し極性を再構築することが確認されている。そこで TGP 培養系における細胞接着因子の発現変化を調べた。接着結合および密着結合を担う E-cadherin、occludin は単層培養に比べ、蛋白レベルで発現の亢進が確認されたが、ギャップ結合を形成する connexin32 は変化が見られなかった。さらに E-cadherin は単層培養系では細胞接着面と一部細胞質にも局在するが、TGP 培養系ではより細胞接着面に集積しており、さらに 4-5 個の細胞に囲まれた細胞間部位に高い頻度で観察された。

[吉崎佐矢香、村上恭子、石井孝司、鈴木哲朗、脇田隆字]

(8) TGP 三次元培養ヒト肝癌細胞におけるチトクローム P450 の発現と機能解析

TGPにおいて三次元培養されたHuh7細胞を用いて、肝臓の代表的な分化機能である薬物代謝について単層培養と比較解析を行った。薬物代謝酵素 P450のうち、最も重要なCYP3A4は、TGP培養系において活性の亢進と遺伝子発現の亢進が認められた。またCYP3A4の遺伝子発現を調節する転写因子PXRの遺伝子発現の亢進も認められた。さらに、CYP3A4のプロモーター領域に存在し遺伝子発現調節に重要なE6配列を用いたゲルシフトアッセイから、TGP培養系ではプロモーター遺伝子への転写因子結合が亢進していることが示唆された。

[吉崎佐矢香、村上恭子、相崎英樹、石井孝司、鈴木哲朗、脇田隆字]

(9) TGP 三次元培養における Insulin-like growth factor binding protein 3 (IGFBP3)の発現と機能解析

TGP三次元培養系と単層培養系では細胞遺伝子発現にどのような違いがあるかを明らかにするためマイクロアレイ解析を行った。その結果、三次元培養に伴い細胞増殖制御、細胞分化調節、細胞内輸送、脂質代謝に関連する遺伝子群の発現変動が認められた。その中でIGFBP3の発現上昇は特に顕著であり、IGFBP3を強制発現させたHepG2細胞では増殖効率の低下が認められたことから、肝癌細胞の三次元培養に伴うIGFBP3の発現上昇が細胞増殖度低下に寄与している可能性が示唆された。

[葛岡健太郎、相崎英樹、吉崎佐矢香、長尾 桓(東京医

大)、鈴木哲朗、脇田隆字]

<別> 検査業務

第1室:

行政検査

E型肝炎確認検査 2件、2検体

検定業務

経口生ポリオワクチン 小分製品 1件

経口生ポリオワクチン バルク 1件

第2室:

行政検査

平成19年度は10件(計30検体)の行政検査依頼があり、ウイルス分離同定、PCR-RFLPあるいは塩基配列解析等による型内株鑑別試験等を実施した。型内鑑別あるいは塩基配列解析を行ったポリオウイルスは、すべてワクチン株と同定された。

第3室、第4室:

依頼試験

C型肝炎ウイルス体外診断薬 2件

第5室:

検定業務

乾燥組織培養不活化A型肝炎ワクチン 2件

組換え沈降B型肝炎ワクチン(酵母由来) 4件

沈降B型肝炎ワクチン(huGK-14細胞由来) 6件

発表業績一覧

I. 誌上発表

1. 欧文発表

- 1) Aizaki H, Suzuki T: RNA replication of hepatitis C virus. *In: Structure-based Study of Viral Replication*. pp.151-173, 2007.
- 2) Aizaki H, Morikawa K, Fukasawa M, Hara H, Inoue Y, Tani H, Saito K, Nishijima M, Hanada K, Matsuura Y, Lai MM, Miyamura T, Wakita T, Suzuki T: A Critical Role of Virion-Associated Cholesterol and Sphingolipid in Hepatitis C Virus Infection. *J Virol* (in press).
- 3) Akazawa D, Date T, Morikawa K, Murayama A, Miyamoto M, Kaga M, Barth H, Baumert TF, Dubuisson J, Wakita T: CD81 expression is important for the permissiveness of Huh7 cell clones for heterogeneous hepatitis C virus infection. *J Virol* 81: 5036-5045, 2007.
- 4) Arita M, Nagata N, Iwata N, Ami Y, Suzaki Y, Mizuta K, Iwasaki T, Sata T, Wakita T, Shimizu H: An attenuated strain of enterovirus 71 belonging to genotype a showed a broad spectrum of antigenicity with attenuated neurovirulence in cynomolgus monkeys. *J Virol* 81: 9386-9395, 2007.
- 5) Arita M, Ami Y, Wakita T, Shimizu H: Cooperative effect of the attenuation determinants derived from poliovirus Sabin 1 strain is essential for attenuation of enterovirus 71 in the NOD/SCID mouse infection model. *J Virol* 82: 1787-1797, 2008.
- 6) Arita M, Wakita T, Shimizu H: Characterization of pharmacologically active compounds that inhibit poliovirus and enterovirus 71 infection. *J Gen Virol* (in press).
- 7) Ariumi Y, Kuroki M, Abe K, Dansako H, Ikeda M, Wakita T, Kato N: DDX3 DEAD-box RNA helicase is required for hepatitis C virus RNA replication. *J Virol* 81: 13922-13926, 2007.
- 8) Bingjun T, Yoshida H, Yan W, Lin L, Tsuji T, Shimizu H, Miyamura T: Molecular typing and epidemiology of non-polio enteroviruses isolated from Yunnan Province, the People's Republic of China. *J Med Virol* 80: 670-679, 2008.
- 9) Date T, Miyamoto M, Kato T, Morikawa K, Murayama A, Akazawa D, Tanabe J, Sone S, Mizokami M, Wakita T: An infectious and selectable full-length replicon system with hepatitis C virus JFH-1 strain. *Hepato Res* 37: 433-443, 2007.
- 10) Delgrange D, Pillez A, Castelain S, Cocquerel L, Rouillé Y, Dubuisson J, Wakita T, Duverlie G, Wychowski C: Robust production of infectious viral particles in Huh-7 cells by introducing mutations in hepatitis C virus structural proteins. *J Gen Virol* 88: 2495-2503, 2007.
- 11) Fujimoto T, Shinohara M, Ito M, Okafuji T, Nishio O, Yoshida H, Shimizu H, Chikahira M, Phan GT, Ushijima H: Detection of dual-infected cases of adenoviruses and coxsackieviruses type B by real-time PCR but not by the conventional viral culture technique. *Clin Lab* 53: 605-609, 2007.
- 12) Guix S, Asanaka M, Katayama K, Crawford SE, Neill FH, Atmar RL, Estes MK. *J Virol* 81: 12238-12248, 2007.
- 13) Hamaguchi T, Fujisawa H, Sakai K, Okino S, Kurosaki N, Nishimura Y, Shimizu H, Yamada M: Acute encephalitis in an adult due to intrafamilial transmission of enterovirus 71. *Emerg Infect Dis* 14: 828-830, 2008.
- 14) Hansman GS, Oka T, Li T-C, Nishio O, Noda M, Takeda N: Detection of Human Enteric Viruses in Japanese Clams. *J Food Prot* (in press).
- 15) Hansman GS: Insights into the Caliciviridae family. *Structure-based Study of Viral Replication*. Editors: Cheng RH and Miyamura T. World Scientific Publishing. pp381-399. ISBN: 981270406X
- 16) Hansman GS, Oka T, Sakon N, Takeda N: Antigenic diversity of human sapoviruses. *Emerg Infect Dis*

ウイルス第二部

- 13: 1519-1525, 2007.
- 17) Hiraga N, Imamura M, Tsuge M, Noguchi C, Takahashi S, Iwao E, Fujimoto Y, Abe H, Maekawa T, Ochi H, Tateno C, Yoshizato K, Sakai A, Sakai Y, Honda M, Kaneko S, Wakita T, Chayama K: Infection of human hepatocyte chimeric mouse with genetically engineered hepatitis C virus and its susceptibility to interferon. *FEBS Lett* 581: 1983-1987, 2007.
- 18) Inoue Y, Murakami K, Hmwe SS, Aizaki H, Suzuki T: Transcriptomic comparison of human hepatoma Huh-7 cell clones with different hepatitis C virus replication efficiencies. *Jpn J Infect Dis* 60: 173-178, 2007.
- 19) Iritani N, Seto T, Hattori H, Natori K, Takeda N, Kubo H, Yamano T, Ayata M, Ogura H, Seto Y: Humoral Immune Responses Against Norovirus Infections of Children. *J Med Virol* 79: 1187-1193, 2007.
- 20) Iritani N, Kaida A, Kubo H, Abe N, Murakami T, Vennema H, Koopmans M, Takeda N, Ogura H, Seto Y: An atypical epidemic of GII.2 genotype noroviruses during the spring period of 2004 in Osaka City, Japan. *J Clin Microbiol* (in press).
- 21) Ishii K, Iijima S, Kimura N, Lee YJ, Ageyama N, Yagi S, Yamaguchi K, Maki N, Mori K, Yoshizaki S, Machida S, Suzuki T, Iwata N, Sata T, Terao K, Miyamura T, Akari H: GBV-B as a pleiotropic virus: distribution of GBV-B in extrahepatic tissues in vivo. *Microbes Infect* 9: 515-21, 2007.
- 22) Ishii K, Murakami K, Hmwe SS, Bin Z, Li J, Shirakura M, Morikawa K, Suzuki R, Miyamura T, Wakita T, Suzuki T: Trans-encapsidation of hepatitis C virus subgenomic replicon RNA with viral structure proteins. *Biochem Biophys Res Commun* (in press).
- 23) Iwai M, Takizawa T, Nakayama T, Matsuura K, Yoshida H, Hasegawa S, Obara M, Horimoto E, Kurata T, Horie H: Evaluation of a two-dose administration of live oral poliovirus vaccine for wild and virulent vaccine-derived poliovirus type 1, 2, 3 strains in Japan. *Scand J Infect Dis* 40: 247-253, 2008.
- 24) Kim CS, Jung JH, Wakita T, Yoon SK, Jang SK: Monitoring the antiviral effect of alpha interferon on individual cells. *J Virol* 81: 8814-8820, 2007.
- 25) Kobune F, Ami Y, Katayama M, Takahashi M, Tuul R, Korukluoglu G, Kiyohara T, Miura R, Sato H, Yoneda M, Kai C: A novel monolayer cell line derived from human umbilical cord blood cells shows high sensitivity to measles virus. *J Gen Virol* 88: 1565-1567, 2007.
- 26) Li TC, Scotti PD, Miyamura T, Takeda N: Latent infection of a new alphanodavirus in an insect cell line. *J Virol* 81: 10890-10896, 2007.
- 27) Miyamoto H, Moriishi K, Moriya K, Murata S, Tanaka K, Suzuki T, Miyamura T, Koike K, Matsuura Y: Involvement of the PA28gamma-dependent pathway in insulin resistance induced by hepatitis C virus core protein. *J Virol* 81: 1727-1735, 2007.
- 28) Miyanari Y, Atsuzawa K, Usuda N, Watashi K, Hishiki T, Zayas M, Bartenschlager R, Wakita T, Hijikata M, Shimotohno K: The lipid droplet is an important organelle for hepatitis C virus production. *Nat Cell Biol* 9: 1089-1097, 2007.
- 29) Mizutani T, Endoh D, Okamoto M, Shirato K, Shimizu H, Arita M, Fukushi S, Saijo M, Sakai K, Limn CK, Ito M, Nerome R, Takasaki T, Ishii K, Suzuki T, Kurane I, Morikawa S, Nishimura H, Rapid genome sequencing of RNA viruses. *Emerg Infect Dis* 13: 322-324, 2007.
- 30) Moriishi K, Mochizuki R, Moriya K, Miyamoto H, Mori Y, Abe T, Murata S, Tanaka K, Miyamura T, Suzuki T, Koike K, Matsuura Y: Critical role of PA28gamma in hepatitis C virus-associated steatogenesis and hepatocarcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 104: 1661-1666, 2007.

- 31) Morikawa K, Zhao Z, Date T, Miyamoto M, Murayama A, Akazawa D, Tanabe J, Sone S, Wakita T: The roles of CD81 and glycosaminoglycans in the adsorption and uptake of infectious HCV particles. *J Med Virol* 79: 714-723, 2007.
- 32) Murakami K, Inoue Y, Hmwe SS, Omata K, Hongo T, Ishii K, Yoshizaki S, Aizaki H, Matsuura T, Shoji I, Miyamura T, Suzuki T: Dynamic behavior of hepatitis C virus quasispecies in a long-term culture of the three-dimensional radial-flow bioreactor system. *J Virol Methods* 148: 174-181, 2008.
- 33) Murakami K, Kimura T, Osaki M, Ishii K, Miyamura T, Suzuki T, Wakita T, Shoji I: Virological characterization of the HCV JFH-1 strain in lymphocytic cell lines. *J Gen Virol* (in press).
- 34) Murayama A, Date T, Morikawa K, Akazawa D, Miyamoto M, Kaga M, Ishii K, Suzuki T, Kato T, Mizokami M, Wakita T: The NS3 helicase and NS5B-to-3'X regions are important for efficient hepatitis C virus strain JFH-1 replication in Huh7 cells. *J Virol* 81: 8030-8040, 2007.
- 35) Nishimura Y, Shimojima M, Tohya Y, Miyazawa T: Molecular cloning of a cDNA encoding the feline CD62L. *J Vet Med Sci* 69: 81-84, 2007.
- 36) Oka T, Yamamoto M, Yokoyama M, Ogawa S, Hansman GS, Katayama K, Miyashita K, Takagi H, Tohya Y, Sato H, Takeda N. Highly conserved configuration of catalytic amino acid residues among calicivirus-encoded proteases. *J Virol* 81: 6798-6806, 2007.
- 37) Okamoto T, Omori H, Kaname Y, Abe T, Nishimura Y, Suzuki T, Miyamura T, Yoshimori T, Moriishi K, Matsuura Y: A Single Amino Acid Mutation in Hepatitis C Virus NS5A Disrupting FKBP8 Interaction Impairs Viral Replication. *J Virol* 82: 3480-3489, 2008.
- 38) Omata K, Suzuki R, Masaki T, Miyamura T, Satoh T, Suzuki T: Identification and characterization of the human inhibitor of caspase-activated DNase gene promoter. *Apoptosis* (in press).
- 39) Ozawa K, Oka T, Takeda N, Hansman GS. Norovirus infections in symptomatic and asymptomatic food handlers in Japan. *J Clin Microbiol* 45: 3996-4005, 2007.
- 40) Sekine-Osajima Y, Sakamoto N, Mishima K, Nakagawa M, Itsui Y, Tasaka M, Nishimura-Sakurai Y, Chen CH, Kanai T, Tsuchiya K, Wakita T, Enomoto N, Watanabe M: Development of plaque assays for hepatitis C virus-JFH1 strain and isolation of mutants with enhanced cytopathogenicity and replication capacity. *Virology* 371: 71-85, 2008.
- 41) Shirakura M, Murakami K, Ichimura T, Suzuki R, Shimoji T, Fukuda K, Abe K, Sato S, Fukasawa M, Yamakawa Y, Nishijima M, Moriishi K, Matsuura Y, Wakita T, Suzuki T, Howley PM, Miyamura T, Shoji I: E6AP ubiquitin ligase mediates ubiquitylation and degradation of hepatitis C virus core protein. *J Virol* 81:1174-1185, 2007.
- 42) Suzuki R, de Borja L, Duarte dos Santos CN, Mason PW: Construction of an infectious cDNA clone for a Brazilian prototype strain of dengue virus type 1: Characterization of a temperature-sensitive mutation in NS1. *Virology* 362: 374-383, 2007.
- 43) Suzuki T, Ishii K, Aizaki H, and Wakita T: Hepatitis C viral life cycle. *Adv Drug Deliv Rev* 59: 1200-1212, 2007.
- 44) Suzuki T, Aizaki H, Murakami K, Shoji I, Wakita T: Molecular biology of hepatitis C virus. *J Gastroenterol* 42: 411-423, 2007.
- 45) Tagawa S, Okamoto T, Abe T, Mori Y, Suzuki T, Moriishi K, Matsuura Y: Human Butyrate-Induced Transcript 1 Interacts with Hepatitis C Virus NS5A and Regulates Viral Replication. *J Virol* 82: 2631-2641, 2008.
- 46) Takao S, Wakatsuki K, Yoshida H, Shimizu H,

- Wakita T: Neutralization Assays for Echovirus 18 Isolates in 2006. *Jpn J Infect Dis* 60: 65-66, 2007.
- 47) Tano Y, Shimizu H, Martin J, Nishimura Y, Simizu B, Miyamura T: Antigenic characterization of a formalin-inactivated poliovirus vaccine derived from live-attenuated Sabin strains. *Vaccine* 25: 7041-7046, 2007.
- 48) Tasaka M, Sakamoto N, Itakura Y, Nakagawa M, Itsui Y, Sekine-Osajima Y, Nishimura-Sakurai Y, Chen CH, Yoneyama M, Fujita T, Wakita T, Maekawa S, Enomoto N, Watanabe M: Hepatitis C virus non-structural proteins responsible for suppression of the RIG-I/Cardif-induced interferon response. *J Gen Virol* 88: 3323-3333, 2007.
- 49) Tuul R, Enkhuya B, Nymadawa P, Kobune F, Suzuki K, Yoshida H, Hachiya M: Measles outbreak after a post-honeymoon period in Mongolia, 2001. *Jpn J Infect Dis* 60: 198-199, 2007.
- 50) Wakita T: HCV research and anti-HCV drug discovery: toward the next generation. *Adv Drug Deliv Rev* 59: 1196-1199, 2007.
- 51) Wang C-Y, Miyazaki N, Yamashita T, Higashiura A, Nakagawa A, Li T-C, Takeda N, Xing L, Hjalmarsson E, Friberg C, Liou D-M, Sung Y-J, Tsukihara T, Matsuura Y, Miyamura T, Cheng RH: Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of recombinant hepatitis E virus-like particle. *Acta Cryst* (in press).
- 52) Wu F-T, Oka T, Takeda N, Katayama K, Hansman GS, Muo C-H, Liang S-Y, Hung C-H, Jiang D-S, Chang JH, Yang J-Y, Wu H-S, Yang C-F: A sapovirus outbreak of gastroenteritis, Taiwan. *Emerg Infect Dis* (in press).
- 53) Yamamoto H, Li TC, Koshimoto C, Ito K, Kita M, Miyashita N, Arikawa J, Yagami K, Asano M, Tezuka H, Suzuki N, Kurosawa T, Shibahara T, Furuya M, Mohri S, Sato H, Ohsawa K, Ibuki K, Takeda N: Serological Evidence for Hepatitis E Virus Infection in Laboratory Monkeys and Pigs in Animal Facilities in Japan. *Exp Animals* (in press).
- 54) Yokota T, Iijima S, Kubodera T, Ishii K, Katakai Y, Ageyama N, Chen Y, Lee J-J, Nishina K, Maki N, Mizusawa H, Akari H: Efficient regulation of viral replication by siRNA in a non-human primate surrogate model for hepatitis C. *Biochem Biophys Res Commun* 361: 294-300, 2007.
- 55) Zeisel MB, Koutsoudakis G, Schnober EK, Haberstroh A, Blum HE, Cosset FL, Wakita T, Jaeck D, Doffoel M, Royer C, Soulier E, Schvoerer E, Schuster C, Stoll-Keller F, Bartenschlager R, Pietschmann T, Barth H, Baumert TF: Scavenger receptor class B type I is a key host factor for hepatitis C virus infection required for an entry step closely linked to CD81. *Hepatology* 46: 1722-1731, 2007.
- 56) Report on phase I wild poliovirus laboratory containment activities, Japan: Draft WHO Report, 2007.
- 57) Country progress report on maintaining polio-free status, Japan, 2006-2008: Draft WHO Report, 2007.

2. 和文発表

- 1) 相崎英樹, 鈴木哲朗, 多田有希, 岡部信彦, 脇田隆字: C型肝炎に関する最近の情報. 結核予防会機関誌「複十字」 21-23, 2008.
- 2) 岩井雅恵, 吉田 弘, 松浦久美子: 富山県内河川のウイルス汚染に関する定点観測. 公衆衛生誌 54: 178-189, 2007.
- 3) 宇田川悦子. パイオテロ等健康危機発生時電子顕微鏡的ウイルス検査の精度管理. 平成19年度厚生労働科学研究費補助金「健康危機発生時の地方衛生研究所における調査及び検査体制の現状把握と検査等の精度管理体制に関する調査研究-2 小倉班研究報告書, 平成19年3月.
- 4) 片山和彦. 「ノロウイルス複製系における最近の知

ウイルス第二部

- 見」, IASR Vol.28 p 293-294 : 2007.
- 5) 片山和彦 養護教諭のなんでも質問箱 ノロウイルスについて 「心と体の健康」株式会社 健学社, Vol.11 No.117, 86-88, 2007.
 - 6) 金守 良, 井本 勉, 婦木秀一, 金 啓二, 谷口美幸, 長野基子, 堀田 博, 勝二郁夫, 神原芳浩, 前川陽子, 工藤正俊, 林 祥剛: 1b 型高ウイルス量高齢者C型慢性肝炎に対するPEG IFN -2b/リバビリン治療(併用療法)の検討, 肝臓 49: 145-152, 2008.
 - 7) 嶋崎典子, 岡田義昭, 米山徹夫: 医薬品からの感染が危惧されるウイルス疾患と安全対策. 月刊薬事 49: 566-568, 2007.
 - 8) 清水博之: エンテロウイルス感染症. 感染症 37: 117-126, 2007.
 - 9) 清水博之: 手足口病. 日本臨床 65: 339-342, 2007.
 - 10) 清水博之: ポリオの疫学. Journal of Clinical Rehabilitation 16: 114-120, 2007.
 - 11) 清水博之: 急性灰白髄炎, 総合臨床 57: 335-336, 2008.
 - 12) 清水博之: ポリオワクチン接種後のワクチン関連麻痺. 日本医事新報 4376: 114, 2008.
 - 13) 白土(堀越)東子: ノロウイルスと血液型抗原. 食品衛生研究 57: 27-34, 2007.
 - 14) 白土東子, 武田直和: ノロウイルスと血液型抗原. ウイルス 57: 181-190, 2007.
 - 15) 宗村徹也, 藤本嗣人, 近平雅嗣, 木村博一, 西尾治, 吉田 弘, 岡部信彦, 辻 勉: エンテロウイルス遺伝子診断法における市販 RNA 抽出キット選択の影響. 感染症学雑誌 82: 55-57, 2008.
 - 16) 染谷雄一: ノロウイルスによる感染性胃腸炎. Medico 38:301-305, 2007.
 - 17) 高山直秀, 崎山 弘, 清水博之, 宮村達男, 加藤達夫, 梅本 哲: 麻疹ワクチン, 風疹ワクチン, ポリオ生ワクチン全国累計接種率. 2006 年度調査結果. 小児科臨床 60: 41-48, 2007.
 - 18) 武田直和: ウイルス性経口感染症について - E 型肝炎とノロウイルス胃腸炎 - 獣医公衆衛生研究, 全国公衆衛生獣医師協議会 10: 4-7, 2007.
 - 19) 武田直和: 食品媒介ウイルス感染症. 日本食品微生物学会雑誌 25: 1 - 6, 2008 .
 - 20) 田中智之, 武田直和: ノロウイルスの現状と院内感染対策. 感染症 37: 94-104, 2007.
 - 21) 田中智之, 武田直和: 食中毒各論「ノロウイルス」食中毒予防必携(第2版)日本食品衛生協会 p212-221, 2007.
 - 22) 田中智之, 三好龍也, 内野清子, 武田直和: 調理従事者を介して起こるノロウイルス感染症. 食と健康 10: 6-14, 2007.
 - 23) 田中智之, 三好龍也, 内野清子, 武田直和: 院内発生時における感染拡大防止対策 ノロウイルス薬事. じほう社 49: 1647-1652, 2007.
 - 24) 田中智之, 加藤大介, 鎌田公仁夫, 三好龍也, 内野清子, 吉田永祥, 田尻 仁, 奥田真珠美, 中山佳子, 平山吉朗, 北元憲利, 武田直和: ノロウイルス迅速抗原検査. 検査と技術, 医学書院 235-239, 2008.
 - 25) 本村和嗣, 岡智一郎, 中村浩美, 守 宏美, Hansman Grant, 横山 勝, 片山和彦, 神田忠仁, 武田直和, 佐藤裕徳 「2006 秋冬期シーズンに流行したノロウイルス GII/4 株のゲノム解析」病原体微生物情報 (IASR) 10月号 p3-p4, 2007.
 - 26) 本村和嗣, 岡智一郎, 佐藤裕徳 「2006 年に我が国に流行したノロウイルス GII/4 株のゲノム解析」食品衛生研究 11 月号 日本食品衛生協会 p19-26, 2007.
 - 27) 米山徹夫: 乾燥組織培養不活化 A 型肝炎ワクチン, 沈降 B 型肝炎ワクチン. 生物学的製剤基準解説 じほう社, 2007.

II. 学会発表

I. 国際学会

- 1) Wakita T: HCV replication Update. 17th Asian Pacific Association for the study of the Liver (APASL) Conference. Kyoto, Japan, 2007.3.27.
- 2) Li TC: Hepatitis E virus. Training on Practical Technologies for Control of Health Emergency, Hangzhou, China, 2007.4.16-22.
- 3) Takeda N: Norovirus. *ibid*.
- 4) Someya Y, Takeda N, Wakita T: Glutamate 54 of Norovirus 3C-like Protease. The 8th

ウイルス第二部

- International Symposium on Positive-Strand RNA Viruses, Washington DC, USA, 2007.5.26-30.
- 5) Li TC, Scotti PD, Miyamura T, Takeda N: Latent infection of a new alphanodavirus in an insect cell line. *ibid.*
 - 6) Oka T, Hansman G, Ishida S, Saito H, Shima, Yoshizumi, Miyoshi M, Ikeda T, Shibata C, Ishizuka S, Takeda N: Viral loads of sapovirus. *ibid.*
 - 7) Ishii K, Zhang B, Li J, Shirakura M, Morikawa K, Suzuki R, Miyamura T, Wakita T, Suzuki T: Trans-encapsidation of HCV subgenomic replicon RNA with viral structure proteins. *ibid.*
 - 8) Suzuki R, Fayzuln R, Mason PW: Identification of mutated cyclization sequences that permit efficient replication of West Nile virus genomes. ASV 26th annual meeting. Corvallis Oregon, USA 2007.7.
 - 9) Shimizu H: Emergence and transmission of vaccine-derived polioviruses. Genetic Recombination and Prevalence of HEV-C- Emerging Infectious Disease Workshop, Taipei, 2007.8.
 - 10) Wakita T, Aizaki H: Critical roles of virion-associated cholesterol and sphingolipids in the viral infectivity. The 7th Awaji International Forum on Infection and Immunity, Awaji, Hyogo, 2007.9.1-5.
 - 11) Murakami K, Shoji I, Hamamoto I, Suzuki T, Miyamura T, Wakita T: Virological characterization of HCV JFH-1 strain in B-lymphocytes. 14th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Glasgow, UK 2007.9. 9-13.
 - 12) Fischer R, Gorke S, Lan L, Rau SJ, Wakita T, Blum HE, Zeisel MB, Baumert TF: Hepatitis C virus replication sensitizes human hepatoma cells to TRAIL-induced apoptosis. *ibid.*
 - 13) Mateu G, Donis RO, Bukh J, Wakita T, Grakoui A: Intragenotypic chimeric hepatitis C viruses produce high levels of infectious particles but cause increased cell death. *ibid.*
 - 14) D Sir, W-I Chen, T Wakita, T.S. B Yen and J.-H. J Ou: Induction of autophagy by hepatitis C virus VIA endoplasmic reticulum stress. *ibid.*
 - 15) Pödevin P, Lagaye S, Carpentier A, Aoudjehane L, Carrière M, Zaïdi S, Dreux M, Scatton O, Wakita T, Cosset F-L, Conti F, Calmus Y, Rosenberg AR: Production of infectious hepatitis C virus in primary culture of human adult hepatocytes. *ibid.*
 - 16) Kato T, Choi Y, Elmowalid G, Sapp R, Furusaka A, Wakita T, Krawczynski K, Liang J: The hepatitis C virus JFH-1 is associated with attenuated infection and low virulence in chimpanzee. *ibid.*
 - 17) Machida K, Huang J, Wang C-H, Liu H, Kondo Y, Sung V, Wakita T, Lai M: Preferential lymphotropism vs. hepatotropism of different HCV isolates established through infectious full-length viral RNA studies. *ibid.*
 - 18) Ariumi Y, Kuroki M, Abe K, Dansako H, Ikeda M, Wakita T, Trono D, Kato N: DNA damage sensors, ATM and Chk2, are required for hepatitis C virus RNA replication. *ibid.*
 - 19) Sakamoto N, Sekine-Osajima Y, Mishima K, Nakagawa M, Tasaka M, Nishimura-Sakurai Y, Yamamoto M, Onui Y, Sudo G, Itsui Y, Wakita T, Watanabe M: Development of plaque-forming assays for hepatitis C virus and isolation of mutants with enhanced cytopathogenicity and replication capacity. *ibid.*
 - 20) Zeisel MB, Koutsoudakis G, Schnober EK, Haberstroh A, Blum HE, Cosset FL, Wakita T, Jaek D, Doffoel M, Royer C, Soulier E, Schvoerer E, Schuster C, Stoll-Keller F, Bartenschlager R, Pietschmann T, Barth H, Baumert TF: Scavenger receptor BI is required for an entry step closely linked to CD81. *ibid.*
 - 21) Delgrange D, Pillez A, Castelain S, Cocquerel L, Rouille Y, Dubuisson J, Wakita T, Duverlie G, Wychowski C: Robust production of infectious

ウイルス第二部

- viral particles in Huh-7 cells by introducing mutations in HCV structural proteins. *ibid.*
- 22) Aizaki H, Fukasawa M, Morikawa K, Hara H, Tani H, Hanada K, Matsuura Y, Lai MMC, Miyamura T, Wakita T, Suzuki T: Critical roles of virion-associated cholesterol and sphingolipids in the viral infectivity. *ibid.*
- 23) Masaki T, Suzuki R, Miyamura T, Wakita T, Suzuki T: Analysis of NS5A region for hepatitis C virus particle production. *ibid.*
- 24) Murayama A, Date T, Morikawa K, Akazawa D, Ishii K, Wakita T: The important regions for RNA replication and infectious virus particle formation of JFH-1. *ibid.*
- 25) Akari H, Ishii K, Iwasaki Y, Iijima S, Maki N, Mori K, Katakai Y, Kimura N, Yoshizaki S, Ageyama N, Yokota T, Suzuki T, Miyamura T: Development of chronic GBV-B infection in marmosets with smoldering plasma viremia. *ibid.*
- 26) Takahashi H, Akazawa D, Omi N, Nakamura N, Mochizuki H, Suzuki T, Wakita T: An adaptive mutation in E2 glycoprotein allows an efficient production of HCV particles with the epitope-tagged envelope. *ibid.*
- 27) Akazawa D, Takahashi H, Omi N, Date T, Morikawa K, Murayama A, Nakamura N, Mochizuki H, Wakita T: Characterization of infectious HCV particles produced from various liver-derived cell lines. *ibid.*
- 28) Fukasawa M, Nitahara-Kasahara Y, Shinkai-Ouchi F, Sato S, Suzuki T, Murakami K, Wakita T, Hanada K, Miyamura T, Nishijima M: Cellular vimentin content affects the protein level of hepatitis C virus core protein and the activity of hepatitis C virus production in cultured cells. *ibid.*
- 29) Mori Y, Okamoto K, Okamoto T, Komoda Y, Okochi M, Takeda M, Suzuki T, Moriishi K, Matsuura Y: Intramembrane processing by SPP regulates membrane localization of HCV core protein and viral propagation. *ibid.*
- 30) Isogai M, Uenishi R, Hase S, Suzuki R, Suzuki T, Wakita T, Takebe Y: Identification of new class of HCV inhibitors targeted to the entry or late stages in HCV replication cycle using newly developed JFH-1-based infectivity/replication assay. *ibid.*
- 31) Shimoike T, McKenna SA, Lindhou, DA, Wakita T, Puglisi DJ: HCV IRES is a potent activator of PKR but resistant to eIF2 phosphorylation. *ibid.*
- 32) Oka T, Arita-Nishida T, Noda M, Sano D, Ueki Y, Imai T, Omura T, Nishio O, Kimura H, Takeda N, Hansman G: Detection of human sapovirus from clams in brackish water. 14th International Symposium on Health-Related Water Microbiology. Tokyo, Japan, 2007.9.9-15.
- 33) Iwasaki T, Seto S, Arita M, Tajiri-Utagawa E: Inactivation effect of ultraviolet radiation on noroviruses (NV). *ibid.*
- 34) Wakita T: HCV replication in vitro and in vivo, 3rd Pasteur-Areva Course on Blood-Borne Viruses: Hepatitis C Virus, Shanghai, China, 2007.10.15-18.
- 35) Shirato H, Takeda N: Interaction between norovirus and histo-blood group antigens. The 2nd Thailand-Japan Joint Forum on Infectious Diseases. Bangkok, Thailand, 2007.10.
- 36) Aizaki H, Fukasawa M, Morikawa K, Hara H, Tani H, Hanada K, Matsuura Y, Lai MMC, Miyamura T, Wakita T, Suzuki T: The cholesterol and sphingolipids of hepatitis C virus particles play critical roles in the viral infectivity. The 58th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases. Boston, USA 2007.11.2-6.
- 37) Pödevin P, Lagaye S, Carpentier A, Aoudjehane L, Carrière M, Zaïdi S, Meritet JF, Dreux M, Scatton O, Wakita T, Cosset F-L, Conti F, Rosenberg AR, Calmus Y: Production of infectious hepatitis C virus in primary culture of human adult hepatocytes. *ibid.*
- 38) Shoji I, Murakami K, Fukuda K, Osaki M, Suzuki

ウイルス第二部

- T, Miyamura T, and Wakita T: Molecular determinants of E6AP-dependent degradation of hepatitis C virus core protein. *ibid.*
- 39) Masaki T, Wakita T, Suzuki T: Analysis of NS5A region important for hepatitis C virus particle production. *ibid.*
- 40) Someya Y, Takeda N, Wakita T: Ultimate mutational analysis of norovirus 3C-like protease. The 3rd International Calicivirus Conference, Cancun, Mexico, 2007.11.10-13.
- 41) Hansman G, Oka T, Takeda N: Antigenic diversity of human sapoviruses. *ibid.*
- 42) Tanaka T, Motomura K, Yokoyama M, Kanda T, Sato H, Oka T, Hansman G, Naokazu Takeda, Norovirus Surveillance Group of Japan. *ibid.*
- 43) Oka T, Yokoyama M, Yamamoto M, Miyashita K, Hansman G, Katayama K, Takagi H, Tohya H, Sato H, Takeda N: Structural and functional analysis of the calicivirus-encoded 3C-like proteases. *ibid.*
- 44) Katayama K, Sharp T, Ling W, Guix S, Estes MK: A reverse genetics system for human norovirus that produces infectious reporter RNA. *ibid.*
- 45) Seto Y, Iritani N, Seto T, Hattori H, Natori K, Takeda N, Kubo H, Yamano T, Ayata M, Ogura H: Humoral immune responses against norovirus infections of infants. *ibid.*
- 46) Ozawa K, Oka T, Takeda N, Hansman G: Norovirus infections in symptomatic and asymptomatic food-handlers in Japan. *ibid.*
- 47) Guix S, Asanaka M, Katayama K, Crawford SE, Neill FH, Atmar RL, Estes MK: Norwalk virus RNA is infectious in mammalian cells. *ibid.*
- 48) Miyamura T, Li TC, Takeda N: Hepatitis E virus. The 18th Conference of the Asian Pacific Association for the Study of the Liver. Seoul, Korea, 2008.3.23-26.
2. 国内学会
- 1) 脇田隆字: C型肝炎のウイルス培養系の開発とその応用. 第43回肝形態科学研究会, 東京, 2007.5.30.
- 2) 今村道雄, 平賀伸彦, 木村俊之, 畠山剛, 柘植雅貴, 野口千笑, 高橋祥一, 本多政夫, 金子周一, 脇田隆字, 茶山一彰: 培養細胞および動物モデルを用いた肝炎ウイルスのインターフェロン感受性の検討. 第43回日本肝臓学会総会, 東京, 2007.5.31-6.1.
- 3) 相崎英樹, 原弘道, 森川賢一, 宮村達男, 脇田隆字, 鈴木哲朗: 脂質のC型肝炎ウイルス感染, 粒子形成における役割. 同上.
- 4) 森川賢一, 脇田隆字: 培養細胞で作製した感染性C型肝炎ウイルス(HCV)粒子のワクチン開発への応用. 同上.
- 5) 政木隆博, 鈴木亮介, 松田麻未, 松浦善治, 宮村達男, 脇田隆字, 鈴木哲朗: RNA polymerase I システムを用いた感染性C型肝炎ウイルス粒子の作成と抗ウイルス薬の薬効評価への応用. 同上.
- 6) 松浦善治, 森石恆司, 森屋恭爾, 村田茂穂, 田中啓二, 鈴木哲朗, 宮村達男, 小池和彦. HCV コア蛋白質による脂肪酸合成促進と肝細胞癌発症における PA28 \cdot の役割. 同上.
- 7) 堤武也, 松田麻未, 森屋恭爾, 三好秀征, 藤江肇, 四柳宏, 新谷良澄, 小池和彦, 鈴木哲朗, 宮村達男. C型肝炎ウイルスコア蛋白発現細胞におけるミトコンドリア蛋白質のプロテオミクス解析. 同上.
- 8) 箴島裕子, 坂本直哉, 中川美奈, 田坂めぐみ, 櫻井幸, 井津井康浩, 陳正新, 榎本信幸, 脇田隆字, 渡辺守: plaque-forming assay を用いた細胞障害性 HCV の選択と機能解析. 同上.
- 9) 平賀伸彦, 今村道雄, 木村俊之, 柘植雅貴, 野口千笑, 高橋祥一, 本多政夫, 金子周一, 脇田隆字, 茶山一彰: リバースジェネティクスにより作製した HCV 感染マウスを用いた genotype 別のインターフェロン感受性の検討. 同上.
- 10) 森川賢一: The roles of CD81 and glycosaminoglycans in the adsorption uptake of infectious HCV particles. 第20回肝臓フォーラム(東部). 東京, 2007.6.
- 11) 武田直和: ノロウイルスの大流行: 特徴と原因. 第

ウイルス第二部

- 48 回日本臨床ウイルス学会，富山，2007.6.2-3.
- 12) 吉田 弘：シンポジウム 「環境水系の感染症」環境水系の感染症：オーバービュー．同上．
- 13) 清水博之：ポリオウイルスとエンテロウイルスにおけるゲノム遺伝子組換え．同上．
- 14) 若月紀代子，川本大輔，香月隆延，渡邊香奈子，吉田 弘：福岡市における Human Parechovirus 4 の分離．同上．
- 15) 脇田隆字：in vivoとin vitroにおけるHCV複製．第4回ウイルス学キャンプ in 湯河原，湯河原，2007.6.6-7.
- 16) 脇田隆字：C型肝炎ウイルスの基礎研究．第3回広島肝臓プロジェクト研究センターシンポジウム，広島，2007.6.29.
- 17) 脇田隆字：C型肝炎ウイルスの感染および複製増殖機構．第31回阿蘇シンポジウム「ウイルスと戦う」，熊本，2007.7.27-28.
- 18) 脇田隆字：C型肝炎ウイルスの感染増殖機構．The 6th Hepatitis Expert Meeting，軽井沢，2007.8.25.
- 19) 脇田隆字：C型肝炎ウイルスの複製および増殖機構．第27回名古屋肝炎セミナー，第116回名古屋肝炎疾患研究会，名古屋，2007.9.21.
- 20) 武田直和：食品媒介ウイルス．第28回日本食品微生物学会学術総会，東京，2007.9.27.
- 21) 小倉 肇，藤井理津志，大瀬戸光明，西村公志，左近直美，宇田川悦子，後藤俊幸，Gelderblom H: パイオテロ等健康危機発生時の電子顕微鏡的ウイルス検査の精度管理．第23回中国四国ウイルス研究会，松山，2007.10.
- 22) Masaki T, Suzuki R, Matsuda M, Miyamura T, Wakita T, Suzuki T: Production of infectious hepatitis C virus by using RNA polymerase I-mediated transcription. 第66回日本癌学会学術総会，横浜 2007.10.3-5.
- 23) 脇田隆字：Infection and replication of hepatitis C virus. アジア太平洋消化器病週間 Asian Pacific Digestive Week 2007サテライトシンポジウム，神戸，2007.10.17.
- 24) 染谷雄一：第8回プラス鎖RNAウイルス国際シンポジウムの報告．ウイルス性下痢症研究会第19回学術集会，札幌，2007.10.20.
- 25) 片山和彦：ノロウイルスの新知見．同上．
- 26) 染谷雄一，武田直和，脇田隆字：ノロウイルス 3C様プロテアーゼを構成するアミノ酸残基の役割．第55回日本ウイルス学会学術集会，札幌，2007.10.21-23.
- 27) 本村和嗣，岡智一郎，中村浩美，守 宏美，Hansman G，横山 勝，片山和彦，神田忠仁，武田直和，佐藤裕徳：2006-2007年の間に流行したノロウイルスウイルスゲノム解析．同上．
- 28) 小澤一弘，Hansman G，岡智一郎，片山和彦，武田直和：調理従事者から検出されたノロウイルスの遺伝子解析．同上．
- 29) 原田誠也，岡田峰幸，岡智一郎，Hansman G，武田直和：サポウイルスによる乳幼児散発性胃腸炎の分子疫学解析 -熊本県-．同上．
- 30) 石田勢津子，吉澄志磨，三好正浩，奥井登代，岡野素彦，Hansman G，岡智一郎，武田直和：サポウイルスによる胃腸炎集団発生事例-北海道-．同上．
- 31) 斎藤博之，Hansman G，岡智一郎，武田直和：保育園で流行したサポウイルスの解析．同上．
- 32) Hansman G, Oka T, Takeda N: Antigenic diversity of human sapoviruses. 同上．
- 33) 宮下佳奈，岡智一郎，Hansman G，山本真民，片山和彦，小川智子，脇田隆字，武田直和：哺乳動物細胞を用いたサポウイルス様粒子の発現．同上．
- 34) 山本真民，岡智一郎，Hansman G，宮下佳奈，片山和彦，小川智子，脇田隆字，武田直和：サポウイルス粒子形成機構の解析．同上．
- 35) 岡智一郎，横山 勝，宮下佳奈，山本真民，Hansman G，片山和彦，小川智子，脇田隆字，佐藤裕徳，武田直和：カリシウイルスプロテアーゼの基質認識機構の共通性．同上．
- 36) 横山 勝，岡智一郎，山本真民，宮下佳奈，Hansman G，片山和彦，小川智子，神田忠仁，佐藤裕徳，武田直和：サポウイルスプロテアーゼ/ORF1ポリプロテイン複合体の構造解析．同上．
- 37) 片山和彦，Sharp T, Ling W, Guix S, Estes M K: Complete reverse genetics system of the human

ウイルス第二部

- norovirus. 同上.
- 38) 山下哲生, 森 嘉生, 森石恆司, 李 天成, 宮村達男, 武田直和, 月原富武, 吉村政人, 松浦善治: E 型肝炎ウイルス様粒子の結晶化と X 線結晶構造解析. 同上.
- 39) 李 天成, 宮村達男, 脇田隆字, 武田直和: シジミからの E 型肝炎ウイルス遺伝子の検出. 同上.
- 40) 李 天成, 宮村達男, 脇田隆字, 武田直和: キメラマウスにおける E 型肝炎ウイルスの複製. 同上.
- 41) 劉 蘭軍, 恒光 裕, 李 天成, 宮村達男, 脇田隆字, 武田直和: バキュロウイルスを用いたブタサーコウイルス組換え粒子の産生とその応用. 同上.
- 42) 北元憲利, 三好龍也, 内野清子, Grant S. Hansman, 武田直和, 田中智之: サボウイルスに対する単クローン抗体の樹立とその交叉性. 同上.
- 43) 有海康雄, 黒木美沙緒, 阿部健一, 團迫浩方, 池田正徳, 脇田隆字, トロノ・ディディエ, 加藤宣之: DNA 損傷センサー ATM と Chk2 は HCV の RNA 複製に必要な宿主因子である. 同上.
- 44) 有海康雄, 黒木美沙緒, 阿部健一, 團迫浩方, 池田正徳, 脇田隆字, 加藤宣之: HCV の RNA 複製に必要な宿主因子 DDX3 DEAD box RNA ヘリカーゼ. 同上.
- 45) 加藤孝宣, 脇田隆字, HCV JFH-1 株の in vivo での病原性の検討. 同上.
- 46) 海老原敬, 松本美佐子, 脇田隆字, 瀬谷 司: HCV 感染アポトーシス細胞を介した樹状細胞の成熟化. 同上.
- 47) 武部 豊, 上西理恵, 納富香子, 長谷彩希, 鈴木哲朗, 脇田隆字: 感染性 HCV クローン JFH-1 を用いた感染・増殖アッセイに基づくスクリーニングによる新規標的を持つ HCV 阻害剤の同定とその解析. 同上.
- 48) 江角真理子, 石橋真理子, 清水洋子, 森田奈央子, 山口裕美, 高山由理子, 野本聡美, 脇田隆字, 清水一史: L-SIGN 陽性細胞の C 型肝炎ウイルス感染感受性解析. 同上.
- 49) 有田峰太郎, 脇田隆字, 清水博之: エンテロウイルス疑似粒子を用いた抗エンテロウイルス薬の探索・評価. 同上.
- 50) 山下康子, 清水博之, 小池 智: エンテロウイルス 71 感受性マウス L929 細胞の樹立. 同上.
- 51) 水谷哲也, 西村秀一, 酒井宏治, 前田 建, 清水博之, 遠藤大二, 福士秀悦, 西條政幸, 緒方もも子, 倉根一郎, 森川茂: 新興ウイルス感染症の網羅的検出方法の確立と応用. 同上.
- 52) 町田早苗, 西村順裕, 名和 優, 伊藤 雅, 清水博之: Human parechovirus (HPEV) 抗体保有状況の解析. 同上.
- 53) 清原知子, 米山徹夫, 戸塚敦子, 脇田隆字: A 型肝炎ワクチンの接種回数と抗体価の基礎的検討. 同上.
- 54) 嶋崎典子, 清原知子, 戸塚敦子, 梅森清子, 岡田義昭, 米山徹夫: 加熱および加圧による A 型肝炎ウイルスの不活化 - 株間の差異の検討 -. 同上.
- 55) 村上恭子, 勝二郁夫, 木村敬郎, 鈴木哲朗, 宮村達男, 脇田隆字: 血球系細胞における HCV JFH-1 株の感染および複製の検討. 同上.
- 56) 阿部克俊, 村上恭子, 市村徹, 高宮智史, 大崎一直, 鈴木哲朗, 宮村達男, 小池和彦, 脇田隆字, 勝二郁夫: HCV コア蛋白と結合する新規宿主因子 hnRNPH1/H2 の同定と相互作用解析. 同上.
- 57) 下池貴志, Mckenna SA, Lindhout DA, 脇田隆字, Puglisi DJ: HCV IRES は PKR を活性化するが, それによる翻訳は eIF2 のリン酸化耐性である. 同上.
- 58) 相崎英樹, 原弘道, 森川賢一, 井上 寧, 谷 英樹, 松浦善治, 齋藤恭子, 深澤征義, 花田賢太郎, マイケル・ライ, 宮村達男, 脇田隆字, 鈴木哲朗: C 型肝炎ウイルス脂質成分の感染における役割. 同上.
- 59) 尾見法昭, 赤澤大輔, 高橋 仁, 森川賢一, 伊達朋子, 石井孝司, 鈴木哲朗, 脇田隆字: 細胞培養系により産生された C 型肝炎ウイルスの免疫原性に関する検討. 同上.
- 60) 村山麻子, 伊達朋子, 赤澤大輔, 森川賢一, 石井孝司, 鈴木哲朗, 脇田隆字: HCV JFH-1 株の複製および感染性ウイルス粒子形成に重要な領域の解析. 同上.
- 61) 石井孝司, 横田恭子, 長谷川秀樹, 永田典代, 森川茂, 福士秀悦, 水谷哲也, 鈴木哲朗, 田代真人, 田口文広: 高度弱毒化ワクチニアウイルス株 DIs の組換え SARS ワクチンとしての検討. 同上.

ウイルス第二部

- 62) 岩崎優紀, 石井孝司, 飯島沙幸, 榎 昇, 森 健一, 吉崎佐矢香, 木村展之, 片貝祐子, 揚山直英, 鈴木哲朗, 神奈木真理, 宮村達男, 明里宏文: C型肝炎サロゲート霊長類モデル: GBV-B は新世界ザルに潜伏感染する. 同上.
- 63) 伊達朋子, 村山麻子, 赤澤大輔, 森川賢一, 石井孝司, 野本明男, 鈴木哲朗, 脇田隆字: 遺伝子型 2a/2b 間でのキメラウイルスの作製および性状解析. 同上.
- 64) 赤澤大輔, 伊達朋子, 森川賢一, 村山麻子, 尾見法昭, 高橋 仁, 白倉雅之, 鈴木哲朗, 脇田隆字: 肝細胞株における感染性 HCV 粒子の作製と性状解析. 同上.
- 65) 高橋 仁, 尾見法昭, 赤澤大輔, 白倉雅之, 鈴木哲朗, 脇田隆字: エピトープタグを付加した組換え HCV 粒子の作製と性状解析. 同上.
- 66) 森 嘉生, 岡本貴世子, 岡本 徹, 菟田泰正, 鈴木哲朗, 森石恆司, 松浦善治: C型肝炎ウイルスコア蛋白質のシグナルペプチドペプチダーゼによるプロセシングの生物学的意義. 同上.
- 67) 上西理恵, 納富香子, 長谷彩香, 鈴木哲朗, 脇田隆字, 武部 豊: 新規阻害剤探索のための HCV 感染増殖アッセイ系の樹立とその評価. 同上.
- 68) 脇田隆字: 基礎研究に基づくC型肝炎ウイルスの新規治療とワクチン開発. 第10回熊本ウイルス感染症研究会, 熊本, 2007.10.26.
- 69) 清水博之, 牛島廣治: デオキシノジリマイシン誘導体の抗 HIV 作用. お茶の水女子大学糖鎖科学研究教育センターシンポジウム「糖鎖の機能解明と医療への応用」, 東京, 2007.11.
- 70) 脇田隆字: C型肝炎ウイルスの基礎研究. 第22回臨床肝臓カンファレンス, 東京, 2007.11.10.
- 71) 脇田隆字: C型肝炎ウイルス基礎研究の進歩. 第167回高知肝炎症例検討会, 高知, 2007.11.20.
- 72) 武田直和: ノロウイルスの検出技術動向. 生物化学的測定研究会, 第 12 回学術シンポジウム, 東京, 2007.12.1.
- 73) 脇田隆字: C型肝炎ウイルスに対するワクチン開発. 第11回日本ワクチン学会学術集会, 横浜, 2007.12.8-9.
- 74) 永田典代, 清水博之, 阿部 忍, 長谷川秀樹, 佐多徹太郎, 倉田 毅: Sabin 株由来不活化ポリオワクチンの経粘膜ワクチンへの応用の可能性. 同上.
- 75) 清原知子, 佐藤知子, 米山徹夫, 戸塚敦子, 脇田隆字: A型肝炎ワクチンの2回接種による抗体価の推移. 同上.
- 76) 尾見法昭, 脇田隆字: 細胞培養系により産生された C型肝炎ウイルス (HCV) のワクチンとしての可能性検討. 同上.
- 77) 石井孝司, 横田恭子, 長谷川秀樹, 永田典代, 森川茂, 福土秀悦, 水谷哲也, 鈴木哲朗, 田代真人, 田口文広: 高度弱毒化ワクチニアウイルス株 DIs の組換え SARS ワクチンとしての検討. 同上.
- 78) 岡智一郎, 山本真民, 宮下佳奈, ハンスマン・グラント, 片山和彦, 脇田隆字, 武田直和: ネコカリシウイルスプロテアーゼのトランス切断活性の検討. 第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会合同大会, 横浜, 2007.12.11-15.
- 79) 片山和彦, ギックス・スザーナ, シャープ・タイラー, リン・ウェイ, クロフォード・スー (ベイラー医大), 岡智一郎, ハンスマン・グラント, エステス・メアリー: 高効率なノロウイルスリパースジェネティックスシステム. 同上.
- 80) 亀岡洋祐, 長田直樹, 田沼玲子, 平田 誠, 高橋一郎, 笠間 毅, 鈴木哲朗, 猪原登志子, 武曾恵理, 楠田 潤, 橋本雄之, 鈴木和男. 同上.
- 81) 石橋真理子, 清水洋子, 山口裕美, 高山由理子, 野本聡美, 脇田隆字, 清水一史, 江角眞理子: C型肝炎ウイルス感染における肝臓類洞内皮 C型レクチン (L-SIGN) の役割. 同上.
- 82) Munakata T, Wakita T, Nomoto A: Toll-like ewcaptor 3 is a downstream target of Rb/E2F pathway activated by hepatitis C virus. 同上.
- 83) 下池貴志, 染谷雄一, 武田直和, 脇田隆字: ノロウイルスの翻訳開始機構. 同上.
- 84) 脇田隆字: C型肝炎ウイルスの複製および粒子形成. 学術講演会 第10回リサーチフォーラム「ウイルスとヒト」, 東京, 2007.12.22.
- 85) 宇田川悦子: ウイルス感染症学. 綾瀬市, 神奈川県, 2008.1.

- 86) 武田直和: 組換えウイルス様粒子を用いたワクチン開発. 日本発のワクチン開発をめざして -ワクチン開発の研究・評価に関するフォーラム-, 東京, 2008.1.21.
- 87) 北島正章, 松原康一, 遠矢幸伸, 原本英司, 宇田川悦子, 片山浩之, 大垣眞一郎: 上水道の塩素消毒におけるマウスノロウイルスの感染力価および遺伝子数の消長. 水環境学会年会, 名古屋市, 2008.3.
- 88) 宇田川悦子: 自然災害による被害と感染症. 新潟県臨床検査技師会研修会, 新潟, 2008.3.
- 89) 武田直和: 人獣共通感染症としての E 型肝炎. 東京大学食の安全研究センター, 国際シンポジウム「食の安全と感染症疫学」, 東京, 2008.3.14.
- 90) 染谷雄一, 武田直和, 脇田隆字: ノロウイルス 3C 様プロテアーゼの網羅的変異導入解析. 日本薬学会第 128 年会, 横浜, 2008.3.26-28.
- 91) 岡智一郎, 片山和彦, 宮下佳奈, 山本真民, Hansman G, 脇田隆字, 武田直和: サボウイルスプロテアーゼのトランス切断活性. 同上.
- 92) 片山和彦: ノロウイルスの感染及び複製の分子機構. 平成 20 年農芸化学会大会シンポジウム, 粘膜上皮とウイルス感染: 認識と応答の分子機構と感染予防戦略. 名古屋市, 2008.3.26-29.
- 93) 松田 幹, 村上耕介, 鈴木さやか, ハンスマン・グラント, 岡智一郎, 片山和彦: 腸上皮細胞へのノロウイルス・ウイルス様粒子の結合と阻害物質の検索. 同上.

III. その他

- 1) Shirato-Horikoshi H: Histo-blood group antigens and norovirus. Glycoforum. <http://www.glycoforum.gr.jp/>
- 2) 白土(堀越)東子: ノロウイルスと血液型抗原. グライコフォーラム <http://www.glycoforum.gr.jp/>
- 3) 片山和彦 ノロウイルスの遺伝子型 IASR, <http://idsc.nih.go.jp/pathogen/refer/noro-kai-setu1.html>