

## 2. ウイルス第二部

部長 村松 正道

### 概要

ウイルス第二部は、主として消化器系疾患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。

第1室の機能のひとつとして、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が挙げられる。下痢症ウイルスの代表的存在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、米国ペ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た安定的な培養増殖系が確立された。オルガノイド系はノロウイルス複製機構、病原性発現機構解明の基盤となるばかりでなく、ノロウイルス不活化剤、治療薬、予防薬、ワクチン等の評価系として活用できると期待されている。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、ノロウイルスばかりでなく、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。

ワクチンの国家検定業務として、不活化ポリオワクチン、ロタウイルスワクチンを担当している。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、一般財団法人阪大微生物病研究会(テトラビック皮下注シリンジ)、および、KM バイオロジクス株式会社(クアワトロバック皮

下注シリンジ)から出検され、ラット免疫原性試験による力価試験を実施する。また、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(サノフィ:イモバックスポリオ皮下注)、および、サノフィ社の不活化ポリオワクチン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(北里第一三共:スクエアキッズ皮下注シリンジ)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。ロタウイルスワクチンについては、GSK社のロタリックス、MSD社のロタテックの2種類の製剤があり、国家検定試験として、含有するロタウイルスワクチン株の力価試験を実施する。

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ばかりでなく、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など国際的な活動を行っている。

第2室はWHO世界ポリオ根絶計画に参画している。WHOの指定をうけて、世界の特殊専門ラボとして、また西太平洋地域の指定ラボとして世界各地で分離されるポリオウイルスの性状解析を続けた。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

## ウイルス第二部

いる。JICA との共催により実施した第 28 回ポリオ実験室診断技術研修会(ポリオ及び風疹を含むワクチン予防可能疾患の世界的制御のための実験室診断技術としては第 9 回目)ではポリオ・麻疹流行国など各国からの参加者に対して講義および実習を実施した。国内エンテロレファレンスセンターとして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3室および第4室ではB型およびC型肝炎ウイルスの行政研究および基礎研究をおこなった。行政研究としては、肝炎ウイルス感染の予防、肝炎ウイルスキャリア対策、肝癌死亡の減少に貢献することを目的として、肝炎情報の収集とウイルス第二部のホームページにおいてデータベース構築および情報発信をおこなっている。検診で発見されるキャリアの治療導入が重要であり、肝炎ウイルス検査陽性者のフォローアップに関しては自治体、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5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 4 件、B型肝炎ワクチン 30 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る。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、2018年のA型肝炎の流行状況の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、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。2018年12月にはA型肝炎ウイルスおよびE型肝炎ウイルスの検出マニュアルを改定し、公開した。

人事面では、昨年度、第二室の吉田和央研究員、Doan Hai Yen 研究員、第四室の鄭シン研究員が任期終了となった。また、第一室に林豪士博士、第四室に若江亨祥博士、第五室には杉山隆一博士が、任期付研究員(主任研クラス)として着任した。7月には第四室の鈴木亮介主任研究官が、第五室の室長に選任された。

以下のような国際的技術協力をおこなった。

### 第一室

Ya-Ling Tzeng(曾雅鈴)(台湾 CDC)平成 30 年 3 月 26 日～平成 30 年 3 月 30 日、下痢症ウイルス検出の研修  
不活化ポリオワクチン製造に関する WHO ガイドライン更新作業

セービンワクチンの実用化とポリオウイルスの封じ込めに  
伴い、ポリオワクチン製造に関する WHO ガイドライン  
(WHO TRS 926, Annex 2)の記載内容を更新する作業が  
進められている。

[染谷雄一]

平成 30 年 11 月 20 日、21 日に台湾 CDC の黄楷超(Huang Kai-Chau)を受け入れ、下痢症ウイルスの検出法について  
研修

[村上耕介、岡智一郎、染谷雄一]

セービンワクチン力価試験および D 抗原量試験共通化に  
関する国際共同研究

WHO、NIBSC が中心となり、セービンワクチンの力価試験および D 抗原含量試験を共通化するための国際共同研究が、セービンワクチン国際標準品制定を最終目的に

進められている。

[染谷雄一]

## 第二室

Dr. Laura Navika Yamani (インドネシア・アイルランガ大学)

平成 30 年 10 月 1 日～平成 30 年 10 月 5 日、下痢症ウイルスの次世代シーケンス、分子疫学解析の研修

Dr. Cheng-Fen Yang (台湾 CDC) 平成 30 年 12 月 3 日～12 月 14 日、ポリオウイルスおよびエンテロウイルスの実験室診断研修

Dao Thi Hai Anh (ベトナム NIHE) 2019 年 2 月 17 日～2 月 23 日、エンテロウイルスの次世代シーケンス解析研修

## 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 28 年 12 月～平成 29 年 12 月、E 型肝炎ウイルスの分子生物学に関する研究

Hui Li. 中国広東 CDC.平成 29 年 1 月～平成 31 年 1 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

Fangzhu Ouyang. 中国広東 CDC. 平成 29 年 1 月～平成 31 年 1 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

## サーベイランス業務

第五室:

A 型肝炎 466 検体

E 型肝炎 91 検体

## レファレンス業務

第一室:

ノロウイルスレファレンスセンター業務

ノロウイルス検出マニュアルの作成

AMED 研究班(代表 木村博一、分担 調恒明)において作成中の「ノロウイルス検出マニュアル」について、意見交換

し、援助を行った。

[村上耕介、染谷雄一]

衛生微生物技術協議会第 39 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]

品質管理に関する業務

I. 不活化ポリオワクチンの品質管理に関する検討

1. ポリオワクチンの D 抗原含量と免疫原性力価との相関に関する検討

日本で用いられているセービン株由来不活化ポリオワクチンを含む 4 種混合ワクチン製剤、および、参照不活化ポリオワクチン(セービン株)について、D 抗原含量の低下が免疫原性力価と対応しているかを明らかにするため、37℃ および 50℃ で加温劣化したワクチンの免疫原性をラットを用いて検討した。その結果、免疫原性は概ね残存する D 抗原量に依っていることが明らかとなった。

[染谷雄一]

## 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) フェージディスプレイ法によるヒト型抗ノロウイルス抗体の単離と性状解析

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から、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フェージ抗体を単離した。各抗体の性状解析を進めており、交差反応性の高い抗体は、他の遺伝子型株の血液型抗原への結合も阻害するのに対し、交差反応性の低い抗体は、他の遺伝子型株の血液型抗原への結合は阻害しないこと

を明らかにしている。

[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)]

(2) 外力支援近接場照明バイオセンサを用いた実環境サンプル中のノロウイルスの検出

実環境下のノロウイルス検出には、高い検出感度が要求される。外力支援近接場照明バイオセンサ(EFA-NIバイオセンサ)を用いた実環境下のノロウイルスVLP検出を試みた結果、流行株GII.4遺伝子型VLPの検出に成功した。EFA-NIバイオセンサは、磁性粒子と光信号用マーカーで検出対象をサンドイッチすることで「動く光点」を作り出し検出するバイオセンサであり、既存の手法に比べシグナルとノイズの区別が容易である。

[白土東子、安浦雅人(産総研)、守口匡子(藤田医科大学)、藤巻真(産総研)]

(3) ノロウイルスRNA依存的RNAポリメラーゼ活性の細胞内測定系の構築

ノロウイルスのRNA依存的RNAポリメラーゼ(RdRp)のRNA合成活性を哺乳類細胞内で見ることの出来る系を構築するため、RdRpのN末端にFLAG-tag、或いはMyc-tagを融合させた蛋白質を発現、検出する系を構築した。今後この系を用いてRdRpのRNA合成写活性を調べる。

[下池貴志、村松正道]

(4) 胆汁要求性ノロウイルスGII.3の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、抱合胆汁酸がオルガノイドにおけるエンドソーム酸性化を誘導すること、またエンドソーム酸性化を阻害剤で抑制することでGII.3の増殖も抑制されることを見出した。このことから、GII.3は感染の過程で胆汁酸誘導エンドソーム酸性化を利用することが示唆された。

[村上耕介; Tenge VR、Karandikar U、Lin SC、Estes MK (バイラー医科大学)]

(5) 中和抗体によるノロウイルス感染抑制評価系の検討  
ノロウイルス感染を阻害する中和抗体を評価するため、オルガノイドを用いた評価系の検討を行った。ポジティブコントロールとして、ハムスターにGII.3 VLPを免疫して作製した抗血清を用いて検討を行ったところ、GII.3感染が有意に抑制された。引き続き評価系の最適化を行うとともに、中和抗体のスクリーニングを実施する。

[村上耕介、林豪士、村松正道: 橋香奈、小野寺大志、高橋宜聖(免疫部)]

(6) 腸管オルガノイド培養系を用いたヒトノロウイルス感染を制御する新規宿主因子の探索

未分化または分化した腸管オルガノイドにおけるヒトノロウイルス増殖および宿主の遺伝子発現を比較した。感染後24時間において分化誘導した細胞では、未分化細胞に比べ、有意なウイルス増殖が認められた。興味深いことに抗RNAウイルス活性を持つことが知られているIFITM3などのインターフェロン誘導遺伝子(ISGs)が未分化状態で有意に上昇していた。よって、未分化の腸管オルガノイドにてIFITM3などのISGsが非感染時も構成的に発現し、ウイルス増殖の抑制因子として作用している可能性が示唆された。

[林豪士、村上耕介、村松正道]

(7) 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)の直径38 nm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得られた三次元結晶の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)]

(8) 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、精密な三次元立体構造を得た。

[染谷雄一、染谷友美(理化学研究所)]

#### (9) ノロウイルス VP1 タンパク質 P ドメインの X 線結晶構造解析

ノロウイルス GI 株の VP1 タンパク質に由来する P ドメインタンパク質を無細胞合成系により調製した。精製後、三次元結晶を得、X 線結晶構造解析により高解像度の立体構造を得た。

[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) 改良版サポウイルス核酸定量検出系の構築

2006 年以降に新たに見つかったサポウイルスを検出可能とするために、リアルタイム RT-PCR 系の改良版を構築し、サポウイルス陽性ヒト糞便を用いて、現在報告がある 18 遺伝子型すべてを検出可能であることを示した。

[岡智一郎、入谷展弘、山元誠司(大阪健康安全基盤研究所)、森功次(東京都健康安全研究センター)、小川知子(千葉県衛生研究所)、辰巳智香(島根県保健環境科学研究所)、柴田伸一郎(名古屋市衛生研究所)、原田誠也(熊本県保健環境科学研究所)、吳芳姿(台湾 CDC)]

#### (2) ヒトサポウイルス感受性細胞の検索

ウイルス不活化条件の検討、ウイルス感受性規定因子の検索への応用を目指し、ヒトサポウイルスの増殖が可能な培養細胞の検索を実施している。

[高木弘隆(バイオセーフティ管理室)、岡智一郎]

#### (3) サポウイルスリバーシジェネティクス系の評価

ヒトサポウイルスゲノム cDNA を組み込んだ plasmid を培養細胞に導入し、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時に出現する二本鎖 RNA を検出した。安定的なウイルス遺伝子供給/発現ツールとし

ての有用性が期待される。

[岡智一郎、下池貴志]

### 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

##### ア) 2017 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、2017 年に北海道各地の病院で採取されたロタウイルス胃腸炎入院症例の便検体を収集した。砂川市立病院(砂川市)、滝川市立病院(滝川市)、留萌市立病院(留萌市)、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)、浦河赤十字病院(浦河町)、製鉄記念室蘭病院(室蘭市)、八雲総合病院(八雲町)、市立函館病院(函館市)の 10 か所から、それぞれ 25、8、7、7、1、5、1、3、5、1 検体(合計 63 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) 2017 年北海道のロタウイルス検体の NGS 解析

2017 年の 63 検体について、次世代シーケンサー(NGS)を行って全ゲノム配列を解析した。RVA の遺伝子型分布は Wa-like G1P[8]が 1.6%、G2P[4]が 12.7%、equine-like G3P[8]が 61.9%、G8P[8]が 9.5%、G9P[8]が 7.9%、G12P[8]が 1.6%であり、equine-like G3P[8]が圧倒的優勢であった。3 検体は genotyping や PAGE でも検出できず、遺伝子型を特定できなかった。地域別では砂川市立病院で 25 検体中 23 検体、および滝川市立病院では 8 検体全てが equine-like G3P[8]であった。

[藤井克樹、津川毅(札幌医科大学)]

##### (3) 2018 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、2018 年に北海道各地の病院で採取されたロタウイルス胃腸炎入院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)の8か所から、それぞれ4、9、9、8、5、18、9、2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)]

#### (4)2018年北海道のロタウイルス検体のNGS解析

2018年の64検体について、次世代シーケンサー(NGS)を行って全ゲノム配列を解析した。RVAの遺伝子型分布はG1P[8]-E2が48.4%、G2P[4]が23.4%、Human Typical G3P[8]が3.1%、equine-like G3P[8]が1.6%、G9P[8]-E1が12.5%、G9P[8]-E2が3.1%であった。5検体はgenotypingやPAGEでも検出できず、遺伝子型を特定できなかった。G1およびG9では、Wa型遺伝子型構成だがNSP4のみE2のリアソータントが検出された。G1P[8]-E2は留萌以外の7病院で検出されており北海道全域に流行していると考えられた。

[藤井克樹、津川毅(札幌医科大学)]

#### (5)北海道のロタウイルス遺伝子の系統樹解析

2017年および2018年に検出された北海道のRVA株について、各遺伝子の系統樹解析を行った。その結果、2018年に検出されたNSP4リアソータントであるG1P[8]-E2およびG9P[8]-E2は、そのE2型NSP4遺伝子の由来が異なることが明らかとなった。G1P[8]-E2のVP7(G1)は国内では比較的稀なlineage 2であり、そのNSP4遺伝子の由来は東南アジアのG2P[4]株であった。一方、G9P[8]-E2のVP7(G9)はlineage 6であり、そのNSP4遺伝子の由来は日本国内のG2P[4]株であった。

[藤井克樹、津川毅(札幌医科大学)]

#### (6)東京都におけるロタウイルス分子疫学研究

##### ア) 東京都のロタウイルス検体のNGS解析

東京都健康安全研究センターとの共同研究で、東京都におけるA群ロタウイルス(RVA)流行株を調査するため、同センターが2017年および2018年に依頼を受けて検査

したロタウイルス陽性検体について、感染研でNGSによる全ゲノム解析を行った。2017年に検出された50検体のうちG2P[4]が40%、ヒトG3P[8]が8%、ウマ様G3P[8]が28%、G8P[8]が8%、G9P[8]が8%、混合感染が6%であった。2018年に検出された21検体のうちG2P[4]が9.5%、ウマ様G3P[8]が28.6%、G8P[8]が9.5%、G9P[8]が47.6%、混合感染が4.8%であった。

[藤井克樹、小田真悠子、宗村佳子(東京都健康安全研究センター)]

#### (7)東京都のロタウイルス遺伝子の系統樹解析

2017年および2018年に東京都で検出されたRVA株について、各遺伝子の系統樹解析を行った。G9P[8]型のウイルスは通常Wa型の遺伝子型構成であるが、2018年に検出されたG9P[8]型10検体のうち、6検体はNSP4遺伝子がE2型であり、inter-genogroup reassortmentを起していると考えられた。系統解析の結果から、このE2型NSP4遺伝子の由来は、同時期に国内で流行していたG2P[4]株であると考えられた。

[藤井克樹、小田真悠子、宗村佳子(東京都健康安全研究センター)]

#### (8) Multiplex-PCRによるロタウイルスのgenotyping法の改良

Geouveaらが1990年に報告したmultiplex-PCRによるロタウイルスVP7のgenotyping法は、国内でも遺伝子型の判定に長く利用されてきたが、近年の流行株、特にウマ様G3株、G8株、G9株は非特異バンドが現れるなどの不具合から、誤判定されるケースがあることが判明している。これらの不都合を解消するため、G1、G2、ヒトG3、ウマ様G3、G4、G8、G9、およびG12型に対するプライマーセットを再設計し、各型のウイルス株を用いて正しく遺伝子型判定可能であることを実証した。

[藤井克樹、片山和彦(北里大学・北里生命科学研究所)]

#### (9)ロタウイルスのリアルタイムPCR用標準DNAの作製

複数の地方衛生研究所からの依頼を受けて、ロタウイルスのリアルタイム PCR 用の標準 DNA を作製した。多くのリアルタイム PCR 法でターゲットとされている A 群ロタウイルス (Wa 株) の NSP3 遺伝子、および C 群ロタウイルス (HO62 株) の VP7 遺伝子を、それぞれベクター (p-GEM-T Easy Vector System) に挿入し、大腸菌でプラスミドを増幅した。精製したプラスミド DNA を  $4 \times 10^6$  copies/ $\mu$ L に調製し、リアルタイム PCR で適切に増幅されることを確認した後、分注して凍結保存した。これを地方衛生研究所からの依頼に応じて随時送付する体制を確立した。

[藤井克樹]

(10) ガーナで検出されたロタウイルスの遺伝子解析  
下痢症が公衆衛生上きわめて重要な疾患であるガーナでは、下痢検体の45%がAGEウイルス陽性であった。伝播しているロタウイルス遺伝子株解析によると、複雑なリアソータントの存在が明らかとなり、動物からヒトへの直接的伝播あるいはヒトと動物のRVA株間のリアソータント株の可能性が示唆され、次世代シーケンス解析により高頻度の共感染が検出された。ガーナでは、現行ロタワクチンである RotaTeqあるいはRotarixとは異なる型の非典型 G9P[4] DS-1 like 株の検出頻度の上昇が認められた。これら G9P[4] DS-1 like 株は、現在伝播しているRVA株間の段階的なリアソータントにより生じた可能性が高い。また、比較的多くのG9P[4] DS-1 like株が、ブタに由来するNSP2遺伝子を有していた。また、2016年後半以降、ワクチン株との相関性が高い、G1P[8]/G1P[6] Wa-like株の再流行が認められた。ガーナでは現在、高いロタワクチン接種率が報告されており、エスケープ株伝播の可能性も含め、遺伝子型およびアミノ酸変異についての継続的な解析が必要とされる。  
[岩永史朗(東京医科歯科大学)、Francis E. Dennis (Noguchi Memorial Institute for Medical Research)、片山和彦(北里大学)、清水博之、Yen Hal Doan]

(11) Molecular evolution of rotavirus detected in Indonesia and Ghana

In collaboration with Kobe University and Tokyo Medical and Dental University, I have been continued to work on the AGE research in Indonesia and Ghana. In terms of rotavirus in Indonesia, the unusual G3 equine like rotavirus on a DS-1-like genetic backbone was found in Indonesia with 100% of detection rate during 2015-2017. In this year, we continued to analyze the rotavirus positive specimens detected during 2017-2018. We found that the equine-like strains were exclusively detected until May 2017, but in July 2017 they were completely replaced by a typical human genotype (G1 and G3), suggesting that the dynamic changes in RVA genotypes from equine-like G3 to typical human G1/G3 in Indonesia can occur even in the country with low RVA vaccine coverage rate. In Ghana, the G9P[4]-E6 DS-1-like rotavirus strains and G3P[6]-Bovine NSP2 DS-1-like rotavirus strains detected with high prevalence before 2016. However, we found the re-emergence of predominant typical G1P[8]/G1P[6] Wa-like strains from November 2016. The G1P[8] Wa-like strain is fully homotypic to Rotarix G1P[8] vaccine. In Ghana, the rotavirus vaccination coverage is high (estimated at 94% for 2016). And most of G1P[8]/G1P[6] Wa-like rotavirus-positive cases collected from children who received the full dose of Rotarix vaccine. Thus, an understanding of the genetic background of contemporary G1P[8]/G1P[6] Wa-like strains is necessary to determine the evidence of vaccine escape or the natural annual fluctuation in rotavirus strain prevalence.

岩永史朗(東京医科歯科大学)、勝二郁夫(神戸大学)、片山和彦(北里大学)、清水博之、Yen Hal Doan]

## 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。2018年度は、抗血清を6地衛研(25種類)、細胞を10地衛研(20種類)に配布した。

[吉田 弘、有田峰太郎、西村順裕、清水博之]

(2) 地方衛生研究所全国協議会中国四国支部内における信頼性確保に関する取組みについて

地方衛生研究所全国協議会中国・四国支部(H30年度は鳥取県が担当県)と協力し、病原体検査時のトラブル予防のための技術管理研修について、レファレンスセンター連絡会議を活用して実施した。研修は、参加者間でブレインストーミング形式による要因分析を行い、その対策法を検討する机上演習とした。中国四国ブロックで初めて実施した研修であり、運営上の改善点も明らかになったが、費用対効果の点で、ブロック単位で十分に活用可能であると認められた。

[大友麗(鳥取県衛環研)、吉田弘]

(3) 地方衛生研究所全国協議会九州支部内における塩基配列解析データの信頼性確保に向けた取組みについて

地方衛生研究所全国協議会九州支部(平成30年度は熊本県が担当)と協力し、病原体検査時の塩基配列解析結果の質確保を目的とした塩基配列解析装置の稼働状況ベースライン調査を実施、検査フロー改善のための技術管理研修の実証的研究を行った。検査担当者が参加するブレインストーミングを通じた要因分析を行い、問題点、解決法、検証法を討議することで検査法の標準化、質の管理の意義を学ぶ技術管理研修としてのモデルを示すことができた。

[松岡由美子(熊本県環総セ)、濱崎光宏(福岡県保環研)、吉田弘]

(4) 環境水サーベイランスで2013-2016年に検出されたエンテロウイルスの動向

わが国では輸入を想定したポリオウイルス検知のための環境水サーベイランスを2013年より開始している。今般2013-2016年の結果を解析した結果、①下水から分離さ

れるウイルスは無菌性髄膜炎の原因となるエンテロウイルスB群が主であること、②数か月にわたり検出される血清型があり、広い年齢層において不顕性感染によるウイルス伝播を示唆すること、③患者サーベイランスでは稀にしか報告されたことがない血清型が下水のみで分離される現象、等が明らかになった。4年間で2回ポリオウイルスワクチン株が分離されており、今後とも監視体制を維持していく。

[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)、北川和寛(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(山梨県衛環研)、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(岐阜県保環研)、中田恵子(大安研)、中野守(奈良県保研セ)、濱島洋介(和歌山県環保研セ)、三好龍也(堺市衛研)、磯田美穂子(岡山県環保セ)、諸石早苗(佐賀県衛環研)、吉富秀亮(福岡県保環研)、吉田弘]

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

第28回ポリオ実験室診断技術研修会(ポリオ及び麻疹風疹を含むワクチン予防可能疾患の世界的制御のための実験室診断技術としては第9回目)を実施した。感染研での研修期間は2019年1月21日～2月8日、研修参加者は、アフガニスタンから2名、パキスタンから2名、ナイジェリアから2名、マレーシア2名、ベトナム2名の計10名であった。WHOワクチン予防可能疾患実験室ネットワークにおける国家実験室として必要な技術習得のための実習および講義を実施した。ポリオ根絶および麻疹・風疹排除の現状と技術的課題を中心とした講義および討議を行った。

[清水博之、吉田 弘、有田峰太郎、西村順裕、Doan Hai Yen、吉田和央、和田純子、村松正道]

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。本年度はカンボジア 160 検体およびラオス 285 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ポリオウイルス 3 型 1 株が検出されたが、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、Doan Hai Yen、和田純子、清水博之]

(2) ラオスにおける 1 型ワクチン由来ポリオウイルスの流行

2015年9月7日に発症したAFP症例由来の糞便検体から1型ポリオウイルスが分離され、型内鑑別試験およびVP1領域の塩基配列解析により、分離株はSabin 1型との比較で3.3%の変異を有する1型VDPVと同定された。強化AFPサーベイランスに由来するポリオウイルス分離株の解析により、2015年9月から2016年1月にかけて発症した11例のAFP症例が、1型VDPVによるポリオ症例であることが明らかとなった。その後、2016-2018年度にラオスのAFP症例および接触者から分離されたポリオウイルスは、すべてワクチン株と同定され、1型VDPV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、Phengta Vongphrachanh、Bouaphanh Khamphongphane、Bounthanom Sengkeoprathut (Laos EPI)、Walter William Schluter (WHO/WPRO)、Siddhartha Sankar Datta (WHO/Laos)]

(3) 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日に麻痺が発症した、モロベ州ラエの6歳児より、1型VDPVが検出された(VP1領域で14塩基置換)。2019年1月7日現在、PNG22州のうち9州で26例の確定症例が確認され、最後のcVDPV1症例の発症日は2018年10月18日であった。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開始

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、1型ポリオウイルス分離株については、感染研でVP1塩基配列解析を実施した。その結果、3個所の検出サイトに由来する検体から、7株のVDPV1が検出された。

[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)]

(4) 2018年6月27日～29日に、Hotel De Bilt-Utrecht (ユトレヒト、オランダ)で開催されたWHO 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現状と技術的課題について検討した。糞便検体からのポリオウイルス直接検出法の進捗、ポリオウイルス環境サーベイランスの標準化、等に関する技術的評価検討を行った。

[清水博之]

(5) 2018年11月6日～8日に、パスツール研究所(パリ)で開催されたWHO meeting of the Ad Hoc Small Working Group on Improving Polio Laboratory Diagnosticsに参加し、糞便検体からのポリオウイルス直接検出法の進捗に関する技術的評価検討を行った。

[清水博之]

(6) 2018年10月15日～16日に、ロータリー本部(エバンストン)で開催されたThe 22<sup>nd</sup> Polio Research Committee Meetingに参加し、感染性ポリオウイルスを使わない抗体価測定法、貼るIPV開発研究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) 2018年11月26日～11月28日に、ホーチミン・パスツール研究所において開催された、JICA手足口病実験室診断技術研修会に参加し、5カ所の省予防医療センタ

一からの研修参加者(計 9 名)に対して、ポリオ、手足口病を含むエンテロウイルス感染症、および検査にかかわるバイオセーフティについての講義、およびエンテロウイルス遺伝子検査の実習を含む技術指導を実施した。

[Yen Hai Doan、清水博之]

(8) 2019年3月20-21日に、パンパシフィック・ホテル(マニラ、フィリピン)において開催された The 8<sup>th</sup> meeting on vaccine-preventable diseases laboratory networks in the Western Pacific Region に参加し、WHO 西太平洋地域ポリオ実験室ネットワークの現状と今後の課題に関する発表・情報交換を行った。2018年にパプアニューギニアで発生したワクチン由来ポリオウイルスによるポリオ流行等の経験を踏まえ、実験室における非常時・緊急時対応に関する検討がなされた。

[清水博之]

(9) 2019年3月12日~15日に、WHO EMRO 事務所(ヨルダン、アンマン)で開催された WHO 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。3月14日~15日に開催された Informal Consultation of the Global Polio Laboratory Network では、世界ポリオ根絶計画の現状と実験室ネットワークの技術的課題と将来計画についての検討が行われた。

[清水博之]

(10) 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 24<sup>th</sup> Regional Commission for the Certification of Poliomyelitis Eradication in the Western Pacific ドラフト作成と会議資料作成を担当した。

[清水博之]

(11) セービンワクチン力価試験および D 抗原量試験共

通化に関する国際共同研究

WHO、NIBSC が中心となり、セービンワクチンの力価試験および D 抗原含量試験を共通化するための国際共同研究が、セービンワクチン国際標準品制定を最終目的に進められている。平成 28 年 5 月 2 日に行われた会議 (One-day Workshop on Sabin IPV D Antigen Content and Potency Assays Harmonization) で総括された第 1 回国際共同研究成果に基づき、平成 30 年 2 月から 3 月にかけて第 2 回目の国際共同研究として、国際標準品候補品の D 抗原含量試験を実施した。その結果得られたデータを NIBSC に提出した。

[染谷雄一]

12) ポリオワクチン製造に関する WHO ガイドラインの更新作業

セービンワクチンの実用化とポリオウイルスの封じ込めに伴い、ポリオワクチン製造に関する WHO ガイドライン (WHO TRS 926, Annex 2) の記載内容を更新する作業が進められている。平成 28 年 9 月 22 日、23 日の第 1 回会議に続き、第 2 回の会合が平成 29 年 9 月 19 日、20 日にジュネーブで開催され、ワーキンググループメンバーとして参加した。

[染谷雄一]

3. WHO 西太平洋地域の 2018 年のポリオウイルス分離状況

2018 年度にラオスおよびカンボジアから送付された AFP 症例および接触者由来の糞便検体 445 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。

2015 年 9 月 7 日に発症した AFP 症例由来の糞便検体から 1 型ポリオウイルスが分離され、型内鑑別試験および VP1 領域の塩基配列解析により、3.3%の変異を有する 1 型 VDPV と同定された。その後、広範な地域における AFP 症例および接触者の糞便検体から、分子系統学的関連性を有する計 26 株の 1 型 VDPV が検出された。

2018-2019年にかけて、AFP症例および接触者から1型VDPVは検出されず、ラオスにおける1型VDPV伝播は終息したものと考えられる。

一方、パプアニューギニア(PNG)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。いまのところ、最後のcVDPV1症例の発症日は2018年10月18日であった。PNGにおけるVDPV1伝播を検出するため、環境サーベイランスを開始した。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、1型ポリオウイルス分離株は感染研でVP1塩基配列解析を実施した。その結果、3個所の下水採取サイトに由来する検体から、7株のVDPV1が検出された。

[清水博之、吉田弘、有田峰太郎、西村順裕、Doan Hai Yen、和田純子、脇田隆字]

#### 4. 世界ポリオ根絶計画に関わる研究

##### (1) 2型経口生ポリオウイルスワクチン接種に対する腸管免疫応答に関する解析

2価の経口生ポリオウイルス(1,3型)および新規2型不活化ポリオウイルスワクチンもしくは従来の不活化ポリオウイルスワクチン(1,2,3型)を接種後に、2型経口生ポリオウイルスワクチンを投与した子供の便中の中和抗体価を測定するための材料および方法論を提供した。その結果、新規2型不活化ポリオウイルスワクチンは、従来と比べて優れた腸管免疫を誘導しないことが示された。

[有田峰太郎、Peter F. Wright (Department of Pediatrics, Dartmouth-Hitchcock Medical Center, Lebanon, USA)]

##### (2) 2価の経口生ポリオウイルス(1,3型)と不活化ワクチンを組み合わせた接種スケジュールの粘膜免疫への影響の解析

2価の経口生ポリオウイルス(1,3型)と不活化ワクチンを組み合わせた接種スケジュールの2型ポリオウイルスに対する粘膜免疫誘導を測定するための材料および方法論を提供した。結果、経口生ワクチンを組み入れた場合にのみ、便中に中和活性が検出された。不活化ワクチンの接種のみ

では、2型ポリオウイルスに対する中和活性が便中に誘導されなかった。

[有田峰太郎、Peter F. Wright (Department of Pediatrics, Dartmouth-Hitchcock Medical Center, Lebanon, USA)]

##### (3) PI4KBノックアウト細胞の作製

CRISPR/Cas9システムを利用して、ヒト由来RD細胞のPI4KB遺伝子をノックアウトした。この細胞では、ポリオウイルスの感染性は1/10,000以下に低下した。PI4KBをするプラスミドをこの細胞に発現させると、ポリオウイルスに対する感染性が回復した。また、抗ピコルナウイルス化合物MDL-860に耐性を示すPI4KB変異体を発現させると、この細胞でのポリオウイルス感染はMDL-860に耐性を示したことから、外来性に供給されたPI4KBがポリオウイルスの複製をレスキューできることが示された。

[有田峰太郎]

##### (4) 次世代シーケンスによるポリオウイルス遺伝子解析の至適化および標準化

世界ポリオ根絶計画最終段階におけるポリオウイルス病原体サーベイランスに由来する検体の遺伝子検査では、ウイルス伝播やゲノム遺伝子組換えについての、詳細かつ網羅的な遺伝子情報が必要とされることから、次世代シーケンス解析の導入が進められている。その一方、臨床検体・環境検体を用いた次世代シーケンスによるウイルス遺伝子解析の手法は標準化されておらず、遺伝子解析や結果の質的評価法は、かならずしも統一されていない。WHOポリオウイルス実験室ネットワークにおいて、次世代シーケンスによるポリオウイルス遺伝子解析の至適化標準化を図るため、様々なポリオウイルスやエンテロウイルスを含む検体をRIVMで調整し、異なる施設で次世代シーケンス解析を実施するPilot studyを実施した。解析方法と解析結果についてNIBSCで評価を進めている。

[Doan Hai Yen、清水博之、WHO Global Polio Laboratory Network]

##### (5) セービンIPVを抗原とした貼るワクチンの開発研究

世界に先駆けて日本で独自開発され、2012年に定期

接種に導入された弱毒化 Sabin 株由来不活化ポリオワクチン(sIPV) および国内で基盤技術開発が進められているマイクロニードル(MN)を用いた貼るワクチン(sIPV-NM)の開発を進めた。国内 sIPV をベースとした sIPV-MN ワクチンは、既存の注射ワクチンと比較して大きな利便性を有する新たなワクチン製剤として、途上国を含めた世界的ニーズが期待できる。製剤処方検討用に三価混合 sIPV 原液を濃縮し、Sabin 1~3 型の D 抗原量が目標値を達成していることを、D 抗原 ELISA により確認した。sIPV-NM 試作品において、現行注射製剤と同等の sIPV 抗原量を内包する事、十分な穿刺強度を持つ事、十分な皮内溶解性を有する事を確認した。sIPV-MN 製剤の有効性を確認するため、ラットを用いた有効性評価試験により、sIPV-MN 製剤至適化検討を進めた。また、よりヒトに近い動物モデルとして、カンクイザルモデルによる安全性・有効性評価試験を実施した。ラットおよびカンクイザル試験による有効性(中和抗体誘導能)を改善するため、sIPV-MN 製剤処方の至適化検討を進めた。

[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。2018 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 93.9%、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 年調査、2018 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 年調査では 86.6%であり、2018 年調査の値が有意に上回っていた。水痘ワクチン 2 回目接種を受ける際、その時点で未接種であった四混追加接種を併せて受けたために接種率が上昇したことが示唆された。

[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、大石和徳(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 6 年目の 2017 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、2013~2017 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、大石和徳(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) SCARB2 遺伝子をノックアウトした RD 細胞の樹立

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 によって試みた。SCARB2 を標的とする CRISPR/Cas9 を RD 細胞にトランスフェクションし、クローン化した。SCARB2 のノックアウトはウエスタンブロッティングにより確認し、ノックアウト細胞株 (RD-SCARB2-KO 細胞) を樹立した。

[西村順裕、清水博之]

#### (2) RD-SCARB2-KO 細胞へのヒト SCARB2 の安定発現

RD-SCARB2-KO 細胞の樹立の際に、CRISPR-Cas9 のオフターゲット効果によりエンテロウイルス 71 の複製が阻害された可能性を否定するために、ヒト SCARB2 遺伝子の再発現を試みた。EF1a プロモーター下流にヒト SCARB2 遺伝子と FLAG タグを組み込んだ発現プラスミドを RD-SCARB2-KO 細胞にトランスフェクションし、遺伝子導入された細胞を抗生物質で選択した。クローン化し、ヒト SCARB2-FLAG 蛋白質の発現をウエスタンブロッティングで確認し、RD-SCARB2-KO[+SCARB2] 細胞を樹立した。

[西村順裕、清水博之]

#### (3) RD-SCARB2-KO 細胞におけるエンテロウイルス 71 感染性の解析

RD-SCARB2-KO 細胞にエンテロウイルス 71 を感染させ、ウイルス増殖を検討した。SCARB2 をノックアウトしたいずれのクローンにおいても、エンテロウイルス 71 は細胞変性効果を誘導しなかった。したがって SCARB2 のノックアウトが成功していることと、エンテロウイルス 71 の RD 細胞への感染においては SCARB2 が必須であることが確認された。

[西村順裕、清水博之]

#### (4) RD-SCARB2-KO 細胞へのマウス Scarb2 の安定発現

マウス Scarb2 分子がエンテロウイルス 71 の受容体として機能するかどうかを解析するために、RD-SCARB2-KO 細胞へのマウス Scarb2 の安定発現を試みた。EF1a プロモーター下流にマウス Scarb2 遺伝子と FLAG タグを組み込んだ発現プラスミドを RD-SCARB2-KO 細胞にトランスフェ

クションし、遺伝子導入された細胞を抗生物質で選択した。クローン化し、マウス Scarb2-FLAG 蛋白質の発現をウエスタンブロッティングで確認し、RD-SCARB2-KO[+mScarb2] 細胞を樹立した。

[西村順裕、清水博之]

#### (5) マウス Scarb2 のエンテロウイルス 71 受容体機能の解析

RD-SCARB2-KO[+mScarb2] 細胞細胞にエンテロウイルス 71 を感染させ、ウイルス増殖を検討した。エンテロウイルス 71 は RD-SCARB2-KO 細胞に細胞変性効果を誘導しなかったが、RD-SCARB2-KO[+mScarb2] では細胞変性効果を誘導した。したがってマウス Scarb2 はヒト SCARB2 に代替可能な機能的な受容体であることが明らかとなった。

[西村順裕、清水博之]

#### (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、EV-A71, CV-A16, CV-A6 以外の手足口病関連ウイルス (CV-A2, CV-A4, CV-A16 等) の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。2017 年における手足口病の主要な原因ウイルスは、CV-A6 および CV-A16 であり、EV-A71 の検出頻度 (5.2%) は比較的低かった。いっぽう、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 (臨床症状グレード 2B, 3, 4) 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, Nguyen Thi Hien Thanh (NIHE)、清水博之]

#### EV-D68 感染マウスモデルの樹立とウイルス感染の解析

##### (7) エンテロウイルス71抗血清国際標準品樹立のための国際共同研究

手足口病重症例の主要な原因ウイルスは、EV71であることから、アジア諸国では現在、EV71ワクチン開発が積極的に進められている。臨床試験における有効性・安全性の結果を踏まえ、2015年12月、中国で、世界初の不活化エンテロウイルス71ワクチンが承認され、中国市場に導入された。不活化EV71ワクチンの品質管理およびEV71血清疫学解析の国際的標準化のために、EV71中和試験に用いるEV71抗血清国際標準品の樹立が必要とされている。そのため、The WHO collaborative study to establish the 1st International Standard for anti-EV71 serumに参加し、NIBSCから提供される13種類の抗血清(ヒトプール血清等)とEV71 C4 523株を用いたEV71中和抗体価測定を実施した。その結果、EV71抗血清国際標準品候補のうち、14/140がthe 1<sup>st</sup> IS for anti-EV71 serum (Human)に選定された。

[Gill Cooper, Javier Martin (NIBSC)、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・変異研究の基盤を整備した。これを用いて、ウイルスの様々な性質を変えるVP1 145残基の変異の効果を構造レベルで解析し、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

(ゆらぎの変化)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。近年のタンパク質科学の研究により、タンパク質のゆらぎは、分子間相互作用と機能発現に重要な働きをすることがわかってきている。本研究の結果は、VP1 145変異が、カプシドの種々の相互作用部位に影響しうることを示唆している。

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。また、機能未知の領域もあった。いずれもVP1 145とは異なる場所であった。この結果より、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) カニクイザルEV71感染モデルにおけるVP1-145アミノ酸変異の病原性への影響

EV71は、手足口病の主要な原因ウイルスであるとともに重篤な中枢神経疾患の流行に関与するが、重篤化を規定するウイルス・宿主因子および重篤化機構は明らかにされていない。EV71カプシドアミノ酸VP1-145は、EV71分離株間で多様性を有し、PSGL-1受容体特異性、マウス感染モデルにおける病原性、中和抗原性エピトープ、ヒトEV71感染重篤化への関与の可能性等、さまざまなウイルス表現型に関与することが知られている。異なる感染性EV71クローンをベースに作製したVP1-145EおよびVP1-145Gウイルス株を、それぞれ、カニクイザルに静注し、神経病原性、ウイルス増殖および*in vivo*カプシドアミノ酸変異等について比較解析した。VP1-145E株は、VP1-145G株より高い神経病原性を示し、VP1-145G株接種群では、高頻度にVP1-145Eへの変異が認められた。また、VP1-145E株は、VP1-145G株と比較すると感染により誘導される血中中和抗体により中和されにくい傾向が認められた。

[藤井健、小池智(東京都医学研)、網康至(動物管理室)、永田典代(感染病理部)、清水博之]

(10) エンテロウイルス D68(EV-D68)流行対応と実験室診断体制の整備

EV-D68 は *Enterovirus D* に分類され、ライノウイルス同様、温度感受性および酸耐性等のウイルス学的性状を有し、主として呼吸器感染症に関与するユニークなエンテロウイルスである。2014 年、米国で、EV-D68 感染症の広範な流行が発生し、呼吸器感染症だけでなく、急性弛緩性脊髄炎(Acute Flaccid Myelitis: AFM)・急性弛緩性麻痺(Acute Flaccid Paralysis: AFP)や脳神経障害等、中枢神経疾患合併症例から EV-D68 が検出されたことから、エンテロウイルスによる再興感染症として注目を集めた。日本でも、2015 年 8 月以降、病原微生物検出情報における EV-D68 検出数の顕著な増加が認められ、重症例を含む呼吸器感染症由来検体からの EV-D68 検出事例が相次いで報告された。EV-D68 検出事例は、2015 年秋と 2018 年秋に急増したが、2015 年の EV-D68 感染症流行とほぼ同時期に、小児を中心とした AFP/AFM 症例の報告が相次ぎ、一部症例から EV-D68 が検出された。積極的疫学調査の結果、55 人の小児および 4 人の成人を含む 59 例の AFM 症例が報告された。2015 年の AFM 流行曲線は、NESID の EV-D68 検出数の推移と強い相関を示したが、他の病原体検出パターンとの相関は認められなかった。EV-D68 は、鼻咽頭由来検体 5 例、糞便 2 例、CSF1 例、気管吸引、鼻咽頭および血清検体が 1 例から検出された。症例報告、サーベイランス、検体採取や EV-D68 実験室診断の精度・感度等についても考慮する必要があるが、AFP/AFM を含む中枢神経疾患と EV-D68 感染の関連が強く示唆された。

[多屋馨子、花岡希、藤本嗣人(感染症疫学センター)、清水博之]

(11) 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、15 歳以下の急性弛緩性麻痺症例が、感染症法による 5 類感染症全数報告対象疾患となることから、急性弛緩性麻痺の病原体サーベイランスに関する国内外の現状を踏まえ、検査体制の整備を進めた。具体

的には、「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」(厚労科研、多屋班)の作成に協力し、急性弛緩性麻痺 (AFP) サーベイランスとウイルス学的診断の項目の分担執筆を担当した。AFP 症例に由来する便検体の病原体検査は、WHO を中心として進められている世界ポリオ根絶計画における標準的サーベイランスとして世界的に確立した手法であることから、ポリオウイルス検査体制も含めた世界的ポリオ AFP サーベイランスについて整理し、国内外の AFP サーベイランスに大きな齟齬が無いよう、「手引き」の内容に反映させた。

[多屋馨子、藤本嗣人(感染症疫学センター)、清水博之]

(12) Antiviral and cytotoxic activities of Fluoxetine against enterovirus D68

EV-D68 was first identified in 1962 from children with acute respiratory diseases. Before 2005, EV-D68 has been a rare cause of respiratory diseases. However, within the last decade, EV-D68 outbreaks have become more common worldwide. During these outbreaks, numerous children diagnosed with severe respiratory distress induced by EV-D68 infection also developed an acute flaccid myelitis (AFM)/paralysis similar to that caused by poliovirus, EV-70, and EV-71. There are currently no approved antiviral drugs for the treatment of diseases associated with EV-D68 infections. Our study aims to determine the antiviral and cytotoxic activities of Fluoxetine against EV-D68 in vitro experiment. We found that the Fluoxetine capable of inhibiting EV-D68 replication on RD cells.

[Doan Hai Yen、清水博之]

(13) エンテロウイルス D68 感染増殖に関与する宿主因子の探索

宿主細胞内でのエンテロウイルス D68 の生活環については不明な点が多い。ヒト胎児横紋筋肉腫(RD-A 細胞)、グリア芽腫(U-87 細胞)、神経芽細胞腫(SH-SY5Y 細胞)

に Fermon 株 (標準株)、Shimane, Akita (麻痺由来株、呼吸器感染症由来株) を感染させ増殖効率、細胞障害性について解析した。強い細胞障害性を示した細胞、ウイルスの組み合わせに CRISPR/Cas9 gRNA library を用い、EV-D68 感染後の生存細胞からシアル酸の生合成関連遺伝子等を同定した。SLC35A1 および SLC35A2-KO 細胞では、EV-D68 の増殖が顕著に抑制されたことから、シアル酸がウイルス感染に重要な役割を果たしていることが示された。本手法が EV-D68 の感染・増殖に必要な宿主因子の探索に有効なことが示された。今回作成した細胞株は呼吸器・神経系に病原性を有する他のウイルスの感染・増殖に必要な宿主因子の探索にも有用である。

[相崎英樹、渡士幸一、鈴木亮介、清水博之]

(14) 深層学習を用いた手足口病およびヘルパンギーナ症例の新規報告者数の予測

深層学習の一種である LSTM (Long Short Term Memory) モデルを使用して手足口病の流行規模の大きさとヘルパンギーナの流行開始期を予測した。手足口病では、前年度に作製した 5 つの学習済みデータを用いて 2018 年の流行規模をリアルタイムで予測できた。2018 年は予測結果の通り、流行規模は中規模であった。またヘルパンギーナでも前年度に作製した学習済みデータを使用して、2018 年の流行の立ち上がりをリアルタイムで予測できた。2018 年は予測結果の通り、2015-2017 年よりも立ち上がりが遅かった。[吉田和央、清水博之]

(15) 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代表的 IVIG 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 6 株に対する中和抗体価を測定した。CPE 発現を抑制するのに必要な IVIG 製剤希釈倍率により、各製剤の抗 EV-D68 中和活性を評価した。9 種類の IVIG 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、1024 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相関は認められなかった。また、海外および国内の血液に由来する IVIG 製剤間で、製剤中の中和抗体価および EV-D68 株間の中和活性の傾向に顕著な違いは認められなかった。

[吉田和央、清水博之]

(16) エンテロウイルス D68 に対する 1 本鎖化抗体可変領域 (scFv) の作製

ヒト PBMC (末梢血単核細胞) から scFv (single chain Fv) ライブラリーを作製して、エンテロウイルス D68 を抗原とする scFv のスクリーニングを試みた。

[吉田和央、清水博之]

(17) コクサッキーウイルス B2 型感染マウスモデルの解析

コクサッキー B 群ウイルスは、多様なヒト疾患の発症に関与する。我々は、2013 年にコクサッキーウイルス B2 型 (CV-B2) 母子経胎盤感染事例を経験し、本症例から分離された CV-B2 株 (長崎県環境保健研究センターより分与) と近年の CVB2 流行株を新生仔マウスに接種したところ、CV-B2 プロトタイプ株に (Ohio-1 株) 比べて、心筋、膝、神経組織に強い親和性を示し、強い急性壊死性病変を引き起こすことを明らかにした。さらに、CV-B2 臨床分離株 4 株を、7 週齢の BALB/c マウスに、経鼻あるいは経口感染し、臨床症状および in vivo におけるウイルス増殖と病理学的変化を解析したところ、主として経鼻感染マウス群において、体重減少や興奮等の臨床症状が認められ、嗅覚系でのウイルス増殖を示唆する結果が得られた。

[永田典代、岩田奈緒子 (感染病理部)、Doan Hai Yen、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限局しており、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(野生株ポリオウイルスの型特異的根絶および経口ポリオワクチン使用の段階的停止後におけるポリオウイルス取扱い施設関連リスクを最小化するための WHO 世界的行動計画; 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。厚労省結核感染症課、日本ポリオ根絶会議等と協力して、WHO GAPIII によるポリオウイルス病原体バイオリスク管理体制整備に向けた周知と国内対応を進めた。

[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、脇田隆字、村松正道]

#### (3) 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出来るのは、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することとなった。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、残りの血清検体を感染研ウイルス第二部に送付し、2 型中和抗体価測定を行った。今年度は、PEF における 2 型中和抗体価測定 SOP を整備し、6 地域からの約 1450 血清検体について、中和抗体価測定を実施し、結果を各地衛研に送付した。

[有田峰太郎、西村順裕、染谷雄一、清水博之]

#### (4) 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開始した。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]

#### (5) WHO-PIMガイダンスによる保有施設調査

2018年5月に、WHO-PIMガイダンス(Guidance for non-poliovirus facilities to minimize risk of sample collections potentially infectious for polioviruses)最終版が公開され、PIMガイダンスによる検体のリスクアセスメントに基づいたリスク低減策が求められる。WHO-PIMガイダンスに基づいた国内施設調査・報告が必要とされており、PIMガイダンスの内容を国内で周知することが重要となる。PIMガイダンスおよび関連資料の和訳版を作成し、異なる領域の専門家を対象としたPIM保有施設予備調査を実施した。予備調査で得られたコメントを反映し、PIMガイダンスおよび関連資料和訳版の改定を進めた。

[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

#### 1. A型肝炎ウイルス(HAV)に関する研究

##### (1) A型肝炎症例におけるHAV RNA測定に関する検討

2018年は国内都市部において性的接触によるA型肝炎が流行し、その中に遷延例や再上昇をきたす症例もみられた。これらの症例のHAV RNAの変動を検討するためリアルタイムPCRによるウイルス定量系の構築を行った。HAV遺伝子の保存性の高い領域400bpをPCRにて増

幅し、得られたPCR産物をベクターに挿入しクローニングを行った。そのうちコンセンサス配列のクローンを選択し、その配列から分子量を計算しHAV RNAのリアルタイムPCR用のスタンダードRNAを作成した。さらに臨床検体においてリアルタイムPCRによるHAV RNA測定が可能であることを確認した。

[山田典栄:渡邊綱正(聖マリアンナ医科大学)、加藤孝宣]

#### (2) A型肝炎の発生動向調査

日本におけるA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ている。2018年のA型肝炎報告数は925件で、約半数に当たる449検体の遺伝子解析を行った。その内訳は遺伝子型IA 97.6%(うちRIVM-HAV16-090株:89.7%、2017年流行株:6.4%)、IB型0.9%、IIIA型1.6%、IIIB型0%であった。流行の原因は2015年から台湾、EUのMSM間で流行したRIVM-HAV16-090株であった。患者の多くが都市圏に集中し、男性の割合が例年の60%程度から90%に増加していた。また、同性間性的接触の報告も多いことから、日本でもMSMがA型肝炎流行のハイリスク群であることが示された。

[清原知子、杉山隆一、鈴木亮介、村松正道]

#### (3) レポーター遺伝子を持つHAVのin vitro増殖評価系

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をヒト肝臓由来細胞に感染させ、細胞内のルシフェラーゼ活性が継時的に上昇し、さらにその活性はHAV特異的な血清で抑制される事を確認した。ウイルスの増殖をレポーター活性を指標にしたハイスループットの解析が可能となる事から、この系はHAVの増殖を標的とした低分子化合物や、中和抗体のスクリーニング等に有用であると考えられた。

[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) B型急性肝炎症例のHBs抗原陽性持続期間の検討

B型急性肝炎(AH-B) 163例のAH-B発症後のHBs抗原の持続期間について検討を行った。全症例でのHBs抗原陽性持続期間は平均4.0ヶ月であり、Genotype(GT)別ではGTA(84例);5.0ヶ月, GTB(21例);3.2ヶ月, GTC(58例);3.2ヶ月であった。GTAの84例とGTBおよびGTCをNon-GTAとした79例でHBs抗原陽性期間をKaplan-Meier法により検討したところ、GTAではNon-GTAと比較し、有意にHBs抗原陽性期間が長かった。発症から6ヶ月以上HBs抗原が陽性であった症例の割合はGTAではNon-GTAと比較し有意に高く、さらに12ヶ月以上HBs抗原陽性が持続した症例はGTAで5例(6.0%), Non-GTAで3例(3.8%)であった。

[山田典栄:安田清美(清川病院)、奥瀬千晃(川崎市立多摩病院)、渡邊綱正(聖マリアンナ医科大学)、加藤孝宣]

#### (2) IFN- $\lambda$ 3がHBV蛋白合成に与える影響についての検討

培養細胞でのHBV複製モデルを用いてIFN- $\lambda$ 3による抗ウイルス作用の評価を行った。1.38倍長のHBVゲノムを持つ複製コンストラクトをHepG2細胞に導入し、IFN- $\lambda$ 3, IFN- $\alpha$ を添加後、培養上清と細胞内のHBsAgおよびHBcrAgを測定した。その結果、投与したIFN- $\lambda$ 3の濃度依存的にHBsAg, HBcrAgの産生量が低下していた。IFN- $\lambda$ 3;10ng/mL投与により観察されたHBsAg, HBcrAgの産生抑制はIFN- $\alpha$ ;1000IU/mL投与による産生抑制と同様であり、ほぼ同程度の抗HBV作用を有していると考えられた。

[山田典栄:村田一素(国際医療福祉大学)、加藤孝宣]

#### (3) IFN- $\lambda$ 3がHBV感染に与える影響についての検討

HBV感染感受性HepG2-NTCP細胞にHepG2.2.15細胞由来のHBVを感染させ、その後IFN- $\lambda$ 3を添加することでHBV感染に対するIFN- $\lambda$ 3の抗ウイルス活性を評価した。その結果、IFN- $\lambda$ 3;10ng/mLを投与することによりHBc抗原陽性細胞数の著明な減少が観察された。また感染後のHBsAgおよびHBcrAgの産生量も低下していた。さらにIFN- $\lambda$ 3によるHBV感染阻害作用はNanoLuc遺伝

子をもつレポーターHBV(HBV/NL)を用いた検討においても確認された。

[山田典栄:村田一素(国際医療福祉大学)、加藤孝宣]

#### (4) IFN- $\lambda$ 3がHBVcccDNA合成に与える影響についての検討

HBV感染感受性HepG2-NTCP細胞にHepG2.2.15細胞由来HBVを感染させ、その後IFN- $\lambda$ 3, IFN- $\alpha$ を添加した。12日間培養後、感染細胞中のcccDNAをHirt法で抽出しRTD-PCRで測定した。合成されたcccDNA量はIFN- $\lambda$ 3濃度依存的に低下し、IFN- $\lambda$ 3;10ng/mL投与ではIFN- $\alpha$ ;1000IU/mL投与とほぼ同程度のcccDNA合成抑制が観察された。

[山田典栄:村田一素(国際医療福祉大学)、加藤孝宣]

#### (5) IFN- $\lambda$ 3がHBVライフサイクルに与える影響についての検討

IFN- $\lambda$ 3による抗HBV活性の作用機序について検討を行った。HBV複製コンストラクトをHepG2細胞に導入後、IFN- $\lambda$ 3を投与し、細胞内pregenome RNA量を測定した。その結果pregenome RNA量の低下が認められ、IFN- $\lambda$ 3はHBVタンパク質の産生をRNA転写レベルで阻害していると考えられた。さらに同様の系を用いて細胞内のCore蛋白質結合HBV DNA量を測定したところ、IFN- $\lambda$ 3濃度依存的な低下を認め、新規ウイルス粒子の産生も抑制されていると考えられた。

[山田典栄:村田一素(国際医療福祉大学)、加藤孝宣]

#### (6) IFN- $\lambda$ 3によるインターフェロン刺激遺伝子発現誘導の検討

HepG2細胞にIFN- $\lambda$ 3, IFN- $\alpha$ を投与することにより誘導されるISGの評価を行った。またHBV複製コンストラクトを導入したHepG2細胞についても同様の検討を行った。IFN- $\lambda$ 3, IFN- $\alpha$ の投与によりいくつかのISGの強い誘導が認められたが、これらのIFNで誘導されるISGはほぼ同様であり、IFN- $\lambda$ 3のみで誘導される特徴的なISGは認めなかった。さらにこれらのISG誘導はHBV複製コンストラ

クトの導入により影響を受けなかった。また、IFN- $\lambda$ 3 投与において IFN- $\alpha$  の誘導は見られず IFN- $\lambda$ 3 の作用は IFN- $\alpha$  を介したものではないことが確認された。以上の結果から、IFN- $\lambda$ 3 は IFN- $\alpha$  と同様の作用により抗 HBV 活性を發揮していると考えられた。

[山田典栄:村田一素(国際医療福祉大学)、加藤孝宣]

#### (7) HBV 遺伝子型 B 株の複製コンストラクト導入による感染性ウイルス粒子産生の検討

HBV 遺伝子型 B 株の複製コンストラクト導入により効率的な感染性ウイルス粒子の産生が可能なウイルス株の探索を行った。HBV 遺伝子型 B 株に感染している様々な病態の患者血清を用いて HBV 複製コンストラクトを作製した。HBe 抗原陽性の B 型急性肝炎(AH-B)症例3例(Ba 株;1例, Bj 株;2例), B 型慢性肝炎症例1例(Bj)の患者血清を用いた。AH-B 症例由来の HBV 株ではいずれも特徴的な変異は認めなかったが、CH-B 症例由来の HBV 株では *a* determinant 領域にワクチンエスケープ変異として知られている T126A の変異が検出された。これらの配列をもとに 1.38 倍長の HBV 複製コンストラクトを構築し HepG2 細胞に導入後、得られた培養上清を HBV 感染感受性 HepG2-NTCP 細胞に感染させ感染細胞数の評価を行った。その結果、AH-B の Ba 株ではわずかな感染が観察できたが、いずれの HBV 株でも既存の遺伝子型 Bj 株や遺伝子型 C 株を上回る感染効率は確認できなかった。

[山田典栄、村山麻子、大崎由喜、加藤孝宣]

#### (8) 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 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 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 細胞に導入した。得られた培養上清を密度勾配超遠心で精製した後、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、感染性が確認された複数の密度勾配超遠心の分画から DNA を抽出し、サザンブロット法により解析を行った。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]

#### (9) 細胞培養における高感染性 HBV の産生

細胞培養での HBV 感染実験には、HepG2.2.15 または HepAD38 といった HBV 恒常発現細胞由来のウイルスが使用されている。一方で HBV プラスミドの一過性導入によって得られたウイルスは、細胞培養における感染効率が低い。そこで、細胞培養における HBV の感染効率を高める特定のゲノム変異を同定し、その変異を導入した変異ウイルス(HBV-mut)を作製した。HBV-mut プラスミド導入細胞から得られた変異ウイルスは、HBV-wt プラスミド導入により得られたウイルスと比較して、HepG2-NTCP 細胞により効率的に感染することができた。

[村山麻子、大崎由喜、加藤孝宣]

#### (10) 細胞培養における高感染性 HBV の作用点の解析

プラスミドの一過性導入でも高感染性 HBV の産生が可能な HBV 変異株の感染増強機序について検討を行った。その結果、この HBV 変異株では HepG2-NTCP 細胞表面への結合効率が増強されていることが明らかとなった。この高感染性 HBV 変異株の感染は HBIG および preS1 ペプチドの処理によって通常の HBV 株と同様に阻害されることが明らかになり、この HBV 変異株を用いた感染系は抗 HBV 薬のスクリーニング等に使用可能と考えられた。

(村山麻子、大崎由喜、加藤孝宣)

#### (11) 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 複製モデルに NK 細胞によるアポ

トース刺激を加えることでアポトーシスを誘導し、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細胞にNK細胞を加えたところ、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感受性が低下していた。さらにTNFを培養上清中に加えることで誘導されるアポトーシスについても同様の結果が得られた。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]

#### (12) HBV 遺伝子型 A 株によるアポトーシス感受性低下に関わる宿主因子の解析

HBV 遺伝子型 A 株によるアポトーシス感受性の低下に関わる宿主因子の同定のため、アポトーシスの誘導に関わるカスパーゼの活性化について検討を行なった。その結果、TNFの刺激によるCaspase 3/7, Caspase 8, Caspase 9の活性上昇は、遺伝子型 A 株導入細胞では遺伝子型 B, C 株導入細胞と比較して低値を示し、遺伝子型 A 株導入細胞ではCaspase 8の活性化が抑制され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]

#### (13) ワクチンエスケープ変異株の評価が可能なHBV感染系の構築

HBsのa determinant領域は抗原性が高い領域であり、この中のいくつかの変異はHBワクチンにより誘導された抗体により感染中和が不能なワクチンエスケープ変異として知られている。しかしこれらのワクチンエスケープ変異はHBポリメラーゼにも影響を与えるため、HepG2-NTCP細胞への感染が確認できない。そこでHBs抗原領域とHBポリメラーゼが別々のプラスミドから供給されるHBVレポーターウイルス(HBV/NL)を用いてワクチンエスケープ変異の評価が可能な感染系を構築した。ワクチンエスケープ変異を持つHBV/NLの感染はHBワクチンにより誘導された抗体による感染阻害が観察されなかった。

[加藤孝宣、村山麻子、山田典栄、大崎由喜]

#### (14) HBV 陽性パネル検体のHBV配列解析

HBV陽性検体パネル用に日本赤十字社から供与された15本のHBV陽性検体からHBVDNAを分離し遺伝子型の同定とゲノム配列の確認を行った。HBV遺伝子型の同定は、preS1領域をPCRにて増幅し各々の遺伝子型特異的プローブとのハイブリダイゼーション反応で検出するHBV遺伝子型判定キットにより行い、さらにHBVゲノムをPCRで増幅し、その配列を解析することにより確認した。HBV遺伝子型判定キットでは15検体中、遺伝子型A;2検体、B;1検体、C;10検体、B+C;1検体、判定不能;1検体と判定された。15検体中8例でHBV全長の配列が確認できた。遺伝子型判定キットで、B+Cと判定された検体はHBV全長の配列解析では遺伝子型Cであったが、その他の検体では遺伝子型が一致していた。

[山田典栄、大崎由喜、加藤孝宣]

#### (15) HBs 抗原測定用体外診断薬の評価のためのFLAG付加HBs蛋白質の発現と解析

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。精製のためにFLAGタグを付加した様々なウイルス株の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抗原量測定し、同時にFLAG付加蛋白質をELISAで定量した。定量のために付加したFLAGタグはHBs蛋白質の分泌を阻害せず、FLAG ELISAによって定量可能であったが、ELISAの定量感度が充分ではなかった。

[村山麻子、加藤孝宣;百瀬暖佳、浜口功(血液・安全性研究部)]

#### (16) Analyzing the mechanism of HBx-mRNA degradation as a new anti-viral mechanism Hepatitis B virus (HBV)

-x protein is a transcriptional regulator required for the HBV life cycle. HBx also induces complications in the host such as hepatocellular carcinoma. We previously

showed that HBx mRNA is degraded by the Ski2/RNA exosome complex. We found that this system is regulated through the control of Ski2 expression. IL-1 $\beta$  induced the expression of ATF3 transcription factor, which in turn binds to cyclic AMP-responsive element sequence in the Ski2 promoter and is responsible for Ski2 promoter induction by IL-1 $\beta$ . Interestingly, HBx also significantly induced Ski2 expression. This is the first report to show activation of the Ski2/RNA exosome complex by both the host and HBV. Understanding the regulation of the Ski2/RNA exosome system is expected to facilitate prevention of HBx-mediated complications through targeting the posttranscriptional degradation of HBx mRNA.

[Hussein H Aly, Takanobu Kato]

(17) 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 previously identified a host polymerase that affect HBV-DNA titer in HepAD38.7 cells. Further analysis identified its effect on HBV-cccDNA titer. These data were confirmed by analyzing HBV-cccDNA formation after infection in HepG2-NTCP cells. In-vitro cccDNA formation assay also pointed out to the formation of HBV-cccDNA by this polymerase. Mechanistic analysis is going on to identify its function in HBV-cccDNA formation.

[Hussein H Aly, Takanobu Kato]

(18) 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 targeting 300

human genes, we identified MafF as a negative regulator of HBV infection. Further analysis identified its function affects translation from HBV-core promoter, suppress HBV-pgRNA, suppress HBV-core protein, and the consequent suppression of HBV-replication. Mechanistic analysis is undergoing to identify the mechanism by which MafF affects HBV-core promoter activity, and whether it is inducible and can be regulated to suppress HBV.

[Hussein H Aly, Marwa Khalil, Takanobu Kato]

(19) 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 undergoing to identify host factors that play an essential role in the early stages of HBV infection, and try to develop drugs targeting these factors and its function.

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

(20) AID 依存性 HBV ウイルス RNA 低下現象の分子機構の解析

これまで TGF beta がヒト肝細胞に作用した時、activation induced cytidine deaminase (AID)が発現誘導され、HBV のウイルス RNA 量が低下する現象を報告してきた。今回、HBV ウイルス RNA 量をルシフェラーゼで定量できる実験系を用いて、AID がどのように HBV RNA 量を低下させるか検討した。その結果、AID の C 末端、ウイルス産物である Pタンパクの C 末端、ウイルス RNA のイプシロン構造が、AID 依存性 HBV ウイルス RNA 低下現象に必要なことがわかった。

[Que Lusheng、喜多村晃一(金沢大学)、若江亨祥、村松正道]

(21) B 型肝炎ウイルス cccDNA 形成機構の解明

宿主の DNA 修復系因子の一つ、FEN1 が、HBV

cccDNA の形成に必要であることを実験的に示した。宿主ゲノムに挿入された、テトラサイクリンプロモーター下流のトランスジーンから HBV を発現する HepAD38.7 細胞を用いて、FEN1 の発現を siRNA, shRNA レンチウイルスベクター、CRISPR/Cas9 ノックアウトベクターにて低下させると、cccDNA 量が相関して低下し、FEN1 の過剰発現によりレスキューされることが示された。さらに無細胞実験系で rcDNA をリコンビナント精製 FEN1, 及び DNA ポリメラーゼ、DNA リガーゼと反応させることで、in vitro で cccDNA を形成できることを報告した。

[喜多村晃一(金沢大学)、Que Lusheng、若江亨祥:中村卓(長崎大学)、渡士幸一、脇田隆字、村松正道]

#### (22) AlphaScreen 法を用いた HBV 侵入阻害剤の同定

HBV エンベロープタンパク質 LHBs と NTCP 間の相互作用を阻害する化合物を AlphaScreen 法により選抜し、最も阻害効果の高い化合物の一つとしてラパマイシンを同定した。ラパマイシンは NTCP に直接結合することで HBV-宿主細胞の結合を阻害し、HBV 感染を防ぐことが示された。

[佐宗若奈、九十田千子、森下了(株式会社セルフサイエンス)、梁明秀、朴三用(横浜市立大)、村松正道、脇田隆字、渡士幸一]

#### (23) 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。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、若江亨祥、相崎英樹、村松正道、脇田隆字:倉持幸司(東京理科大)、渡士幸一]

#### (24) B 型肝炎ウイルス内在化機構の解明

B 型肝炎ウイルス(HBV)は細胞膜上で感染受容体

NTCP と結合した後にどのようにして細胞内への内在化を果たすかはわかっていなかった。本研究では、上皮成長因子受容体(EGFR)が HBV 内在化に必須であることを明らかにした。EGFR は NTCP と相互作用して細胞内へ内在化しており、HBV はこれらタンパク質の相互作用を利用して細胞内へ侵入することが示された。NTCP-EGFR 相互作用が解消された細胞では NTCP に吸着した HBV は細胞表面に留まったまま内在化しなかった。これら結果は EGFR が HBV 内在化を媒介する受容体共役因子であることを示す。

[岩本将士、佐宗若奈、杉山隆一、石井孝司(品質保証・管理部)、大木規央(横浜市立大学)、永森収志(奈良県立医科大学)、鈴木亮介、相崎英樹:梁明秀(横浜市立大学)、Ji-Hye Yunh (Yonsei University)、三用朴(横浜市立大学)、大谷直子(大阪市立大学)、村松正道:岩見真吾(九州大学)、田中靖人(名古屋市立大学)、Camille Sureau (Institut National de la Transfusion Sanguine)、脇田隆字、渡士幸一]

#### (25) B 型肝炎ウイルス内在化阻害化合物の同定

HepaRG 細胞を用いて FDA 承認化合物ライブラリーより HBV 感染を阻害する化合物 troglitazone を同定した。この化合物は HBV の宿主への吸着に影響することなく、内在化 HBV を低下した。また、troglitazone は NTCP の多量体化を阻害することが明らかとなった。これは NTCP 多量体化が HBV 内在化を引き起こす可能性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が示された。

[深野顕人、九十田千子、大嶋美月:朴三用(横浜市立大)、村松正道、渡士幸一]

#### (26) B 型肝炎ウイルスの適応進化メカニズム解析

HBV の感染受容体 NTCP の配列が種の進化の過程でどのように変化し、受容体としての機能が保存あるいは変化してきたかに関しては全く解析されていない。本研究では系統学的手法を用いることで、NTCP 各サイトの進化速度を解析した。NTCP は哺乳類全体で進化的に保存され

ており、NTCP が宿主の生存にとって重要であるとする過去の報告と一致した。一方で、進化速度が速い部位も複数検出され、その中で158番目のアミノ酸がHBVの吸着・感染を規定していることをウイルス学的な実験により明らかにした。これは、HBV およびその関連ウイルス(ヘパドナウイルス)が NTCP 進化の選択圧となっていた可能性を示唆する初めての報告である。

[竹内(柴田)潤子、村松正道、渡士幸一]

#### (27) B型肝炎ウイルスの侵入制御メカニズム解析

HBV 許容性細胞/非許容性細胞のトランスクリプトーム解析より、HBV 感染許容能に関与する因子を同定した。その後得られた候補因子に対する siRNA を用いて HBV 感染初期過程に与える影響を解析し、HBV 感染能を制御する宿主因子を同定した。これらの因子の1つは、HBV の吸着過程には影響を与えずに HBV 侵入以降の過程を制御する宿主因子であることが示唆された。この因子のノックダウンは NTCP mRNA および NTCP の総タンパク質量には影響を与えず細胞膜表面の NTCP レベルを増加させることから、この因子が NTCP の細胞内の局在を制御する事が示唆された。

[九十田千子、鈴木治和(理研 IMS)、村松正道、渡士幸一]

#### (28) 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1つ同定した。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化合物を同定した。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、渡士孝一、脇田隆宇、豊田哲也(福祉村病院

長寿医学研究所)]

#### (29) 抗ウイルス薬の標的候補分子の同定

テトラサイクリン誘導 HBV 発現細胞の HepAD38 細胞 (genotype D) からサブクローニングされた Hep38.7-Tet 細胞を用いて、細胞外 HBeAg 量を指標に 3 種類の siRNA Library (DNA damage response、Epigenetic、Nucleic Acid Binding) のスクリーニングを実施した。HBeAg 分泌阻害を示した 80 遺伝子を primary hits として選抜した。さらに再現性評価として、HBeAg 分泌阻害及び cccDNA 合成阻害を示した 21 遺伝子を second hits として選抜した。次に Hirt DNA を精製し cccDNA 量の減少と knockdown 効率の相関を検討した。1 遺伝子が cccDNA 産生に関与している可能性が考えられた。[木下渉(JT 医総研)、渡士幸一、脇田隆宇]

(30) 本邦における急性 B 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 2015 年間の 16 年間の急性 B 型肝炎の発生動向を調べ報告した。急性 B 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。全国の県別の発生報告では東京都のみ増加傾向にあった。[Zheng Xin、相崎英樹:高橋琢理、砂川富正、大石和徳(感染症疫学センター)、田中純子(広島大)、脇田隆宇]

#### (31) B型肝炎流行予測調査のサポート業務

B型肝炎ワクチンの定期接種化に伴い、B型肝炎の流行予測調査が開始された。この調査は HBs 抗原、HBc 抗体、HBs 抗体の試験を含み、各検体の試験結果を複合的に判断して、ワクチンの実施状況、効果を評価することを目的とする。第五室では実施機関からの技術的質問および確認検査に対応する。他の VPD 疾患と異なり、調査の過程において被験者の B型肝炎感染が判明する可能性も考えられ、デリケートな対応が求められる。今年度の B型肝炎流行予測調査実施機関は 3 自治体である。これまでに応じたサポート業務は以下の通りである。

・HBs 抗原陽性及び/あるいは HBc 抗体陽性検体の確認試験(行政検査として、2 件、33 検体)

・試験結果の解釈

・被験者への結果通知の作成(科学的な部分)

[清原知子、鈴木亮介、村松正道]

(32)マーシャル諸島におけるB型肝炎ワクチンプログラムの VerificationWPRO の依頼により、マーシャル諸島におけるB型肝炎ワクチンプログラムの Verification に参加した。マーシャル諸島のワクチン接種率を含めて実施状況、今後の Sustainability 等を評価した。大きな課題として、以下3点を指摘した。

・国土が多数の国からなるため、メインアイランド(2 島)とアウターアイランド(その他の島)の地域差が大きい。

・Hep0 は機能しているが、Hep3 の達成率が低い。

・2013 年をピークに HepB3, DTP ともに接種率が下がる傾向にある。

[清原知子、鈴木亮介、村松正道]

(33) B 型肝炎ウイルス(HBV) preS1 領域に対する抗体の誘導

HBV の NTCP への結合に重要な preS1(2-47aa)の抗原性および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を試みた。preS1(2-47aa)領域を様々な形態で発現する計5種類のプラスミドを BALB/c マウスに DNA 免疫し、その血清を評価したところ、抗 preS1 抗体の誘導が認められた。免疫マウスの脾臓から preS1(2-47aa)に特異的な記憶 B 細胞を単離し、培養後の上清に含まれるモノクローナル抗体を評価したところ、97 サンプルで preS1(2-47aa)との結合が認められ、そのうち 8 サンプルでウイルス感染中和効果が認められた。今後は記憶 B 細胞から抗体遺伝子をクローニングし、リコンビナントの抗体を作製し、中和エピトープの解析を行っていく。[矢藤慶悟、小野寺大志(免疫部)、松田麻未・藤本陽(北里大)、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]

3. C 型肝炎ウイルス(HCV)に関する研究

(1) C 型肝炎ウイルスの不活化に関する研究

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。そこで 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(血液・安全性研究部)、脇田隆宇、村松正道:岡田義昭(埼玉医科大学)]

(2) 抗 HCV 活性を持つビタミン D 誘導体の探索

ビタミン D 前駆体の一つである 25ヒドロキシビタミン D3 には抗 HCV 作用があることが知られている。そこで、この作用機序の解明のために、VDR 結合能や転写活性可能な既知のビタミン D 誘導体ライブラリーを用いて抗 HCV 活性を持つ誘導体の探索を行った。HCV 感染細胞をこのビタミン D 誘導体ライブラリーに含まれる薬剤で処理することにより、HCV の増殖を阻害する誘導体をいくつか同定した。これらの薬剤は細胞内での感染性ウイルス粒子の産生を阻害するが、その活性は VDR 結合能や転写活性可能とは関連していなかった。

[村山麻子、加藤孝宣]

(3) ビタミン D 誘導体によるアポリポ蛋白質の発現抑制と HCV 増殖阻害効果の解析

HCV の増殖を阻害するビタミン D 誘導体はアポリポ蛋白質の発現を抑制していた。そこで、アポリポ蛋白質の発現抑制が HCV の感染性ウイルス粒子産生に与える影響の解析を行った。その結果、アポ A1, アポ C3 の発現を siRNA により抑制すると、細胞内、培地中の HCV コア抗原量および感染性ウイルス粒子量が減少したことから、ビタミン D 誘導体によりアポリポ蛋白質減少が感染性ウイルス粒子の産生阻害に関わっていると考えられた。

[村山麻子、加藤孝宣]

(4) HCV 遺伝子型 2a 株に対する NS5A 阻害剤耐性変異の解析

遺伝子型 2a の HCV 株 J6cc ウイルスにおける NS5A 阻害剤耐性変異の解析を行った。NS5A 阻害剤存在下で J6cc ウイルス感染細胞の長期培養を行い、得られた耐性変異を解析した。NS5A 阻害剤処理後 33 日目では NS5A 領域に F28S の変異が出現し、F28C と混在していた。NS5A 阻害剤処理後 48 日目では F28S のみとなり耐性変異である可能性が示唆された。これらの変異を J6cc 株に導入すると、F28C 変異はウイルスの複製には影響がなく、EC50 値を約 10 倍に上昇させ、一方 F28S 変異はウイルスの複製を約 1/4 に低下させたが、EC50 値は約 100 倍に上昇させた。

[村山麻子、Mingjun Huang (Achillion)、加藤孝宣]

(5) HCV 遺伝子型 2b 株に対する NS5A 阻害剤耐性変異の解析

遺伝子型 2b の HCV 株 J8cc ウイルスにおける NS5A 阻害剤耐性変異の解析を行った。NS5A 阻害剤存在下で J8cc ウイルスの感染細胞の長期培養を行い、得られた耐性変異を解析した。NS5A 阻害剤処理後 48 日目では C92R と Y93H が混在していた。これらの変異を J8cc 株に導入すると、ウイルスの複製には影響はなかったが、EC50 値を 100 倍以上に上昇させた。

[村山麻子、Mingjun Huang (Achillion)、加藤孝宣]

(6) P32 欠損変異株が HCV ライフサイクルに与える影響の解析

NS5A 阻害剤に対する耐性変異である P32 欠損は NS5A 阻害剤に対する強い耐性が知られており、DAA 治療不成功例で検出される。そこで NS5A 領域を 1b 株に置換した JFH-1 キメラウイルス株を用いて、P32 欠損を導入し、この変異が HCV ライフサイクルに与える影響を評価した。その結果、この変異は HCV の肝細胞内での複製能を低下させていると考えられた。

[加藤孝宣、村山麻子、大崎由喜、疋田隼人(大阪大学消化器内科)、竹原徹郎(大阪大学消化器内科)]

(7) P32 欠損変異株に有効な抗ウイルス剤の探索

JHF1/5ACon1 キメラウイルスに P32 欠損を導入した株を用いて、各種 DAA に対する薬剤感受性の評価を行った。この P32 欠損変異株は第二世代を含む全ての NS5A 阻害剤に対して強い耐性を示し、EC50 値は通常のキメラウイルス株に比較して高値を示した。しかしプロテアーゼ阻害剤に対しては通常のキメラウイルス株とほぼ同様の、ポリメラーゼ阻害剤である SOF に対しては高い感受性を示した。また IFN- $\alpha$  に対してはほぼ同様の、RBV に対して通常の株よりも高い感受性を示し、SOF と RBV が有効であると考えられた。

[加藤孝宣、村山麻子、大崎由喜、疋田隼人(大阪大学消化器内科)、竹原徹郎(大阪大学消化器内科)]

(8) 感染性 HCV 粒子産生機構の解析

感染性 HCV 粒子産生効率を低下させるフルタミドを利用して、HCV の感染性粒子構築を制御する宿主因子の一つとして芳香族炭化水素受容体(AhR)を同定した。HCV の感染性粒子構築には肝細胞内への脂肪滴の蓄積が重要である。AhR はその活性依存的な、トリグリセリドの産生制御を介して肝細胞内への脂肪滴蓄積を制御することが示唆された。この経路を制御する責任因子の一つとして AhR の下流遺伝子であるシトクロム P450 1A1 を同定した。

[大橋啓史、渡士幸一、深澤征義(細胞化学部)、脇田隆字]

(9) HCV 感染が引き起こす脂質蓄積を標的とした抗 HCV 剤の同定

フラボン誘導体 176 種のスクリーニングから、感染性 HCV 量を強力に低下させる 12 のヒット化合物を得た。特に高い活性を示した #139、#146 は、肝細胞内の脂肪滴量を減少させることで HCV 粒子構築効率を低下させた。またこれらは芳香族炭化水素受容体を介した脂質産生を抑制していることが示唆された。

[西岡華実、大橋啓史、村松正道、脇田隆字、渡士幸一]

(10) HCV に対する抗ウイルス治療後、SVR 後の病態に関する研究

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

[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(ミノファージェン製薬)、市野瀬志津子(東京医科歯科大学)、脇田隆字]

(11) 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。SVR 後も継続する指標としてミトコンドリア障害、核膜異常、軽減する指標として DMV 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(ミノファージェン製薬)、相崎英樹、脇田隆字]

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

NS4B 発現細胞から pull-down 法により NS4B に結合する膜蛋白を精製し、プロテオーム解析、siRNA screening を行ったところ、複製過程に関与するタンパクとして PREB

および SURF4 を見出した。PREB、SURF4 は複製複合体を含む HCV 特有の膜構造物形成に重要な役割を果たしたものと考えられた。

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

(13) 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 形成に関与し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]

(14) 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]

(15) HCV 感染に伴う核膜孔変化の解析

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

[ガオ ユーティン、青柳東代、相崎英樹、山越智(真菌部)、鈴木哲朗(浜松医科大学)、脇田隆字]

(16) 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]

#### (17) 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。HCVRNA 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。

[Zheng Xin、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]

#### (18) GL の Autophagy 誘導のメカニズムの解析

慢性 C 型肝炎患者に用いられているグリチルリチンの抗 HCV 作用について検討した。その結果、HCV 生活環のうち、特に感染性粒子形成において強い阻害効果を示した。その阻害効果は PLA2 の抑制と autophagy 亢進によるものの可能性が示唆された。GL の Autophagy 誘導のメカニズム、PLA2IB の HCV 粒子放出のメカニズムについて調べている。

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

#### (19) 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に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)、脇田隆字]

#### (20) 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)、脇田隆字]

#### (21) 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)、脇田隆字]

#### (22) 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]

#### (23) 患者由来 NS5b キメラレプリコン細胞の作製

ウイルスタンパク質に直接作用する治療薬 Direct-Acting Antiviral (DAA) であるハーボニー剤(レジパスビル; NS5A 阻害薬、ソホスビル; NS5b 阻害薬)で治療後に再燃した 1b 型 HCV 患者由来のウイルスの性状を解析するため、NS5B 領域を 1b 型の con1 株に置換したキメラレプリコンプラスミド(治療例 3 種; con1-92258-2、con1-92258-4、con1-LDV70-2、再燃例 1 種; con1-FF2-4-2)を作成した。野生型の con1、及び 4 種類の患者由来 NS5b キメラレプリコンプラスミド DNA を鋳型にして *in vitro* でレプリコン RNA を合成し、エレクトロポレーション法で Huh 7.5.1 細胞に遺伝子導入した。その後 G418 で選択培養を 3 週間行うことでキメラレプリコン細胞を樹立した。

[Su Su Hmwe、相崎英樹、村松正道、脇田隆宇]

#### (24) 患者由来 NS5b キメラレプリコンに対する DAA の効果

野生型 con1 レプリコン細胞と 4 種の患者由来 NS5b キメラレプリコン細胞に対する薬剤の効果を検討した。DAA としてシメプレビル(NS3 阻害剤)、レジパスビル(NS5A 阻害剤)、ソホスビル(NS5b 阻害剤)の 3 種類を用いた。それぞれのレプリコン細胞について DAA 処理 72 時間後の細胞内ウイルス RNA の変化を調べたところ、すべてのレプリコン細胞で DAA の効果に大きな違いがなく NS5b 領域の置換だけではウイルス複製に影響はなかった。SVR 後に再燃したことからアミノ酸変異による DAA 耐性化が考えられたが、細胞培養系では DAA 耐性化を示す結果が得られなかった。おそらく、他のタンパク領域の変異や宿主側の因子などの関与も考えられた。

[Su Su Hmwe、相崎英樹、村松正道、脇田隆宇]

#### (25) HCV 感染をモニターするための細胞の樹立

前年度は cre-loxP システムで HCV 感染により赤から緑の蛍光を発する細胞をバルクで樹立し、HCV-cre 感染による蛍光の変化を観察した。ただし、この細胞集団は継代を続けると蛍光細胞は減少し、蛍光を発しない細胞集団がその大部分に変わる。今年度は、この細胞集団から赤色の蛍光を安定的に発する細胞を得るため、限界希釈法を行いシングルクローンの樹立を試みた。その結果、安定的に赤蛍光を発する 11 クローンの細胞を樹立した。これらの細胞は、60 日以上継代しても安定的に赤蛍光を発し、更に HCV-cre ウイルスを感染させることで赤から緑の蛍光に変化した。今後はこれらのクローンの性状を解析する。

[渡邊則幸、相崎英樹、村松正道、脇田隆宇]

#### (26) 感染性 4a 型 HCV の性状解析

長期培養で樹立した 2 種類の感染性 ED43-7M クローンについて、感染中和抗体との反応性、Direct-Acting Antiviral (DAA) の効果を解析した。感染中和抗体は linear epitope を認識する HCV1 と構造を認識する AR3A を、DAA については Simeprevir (NS3 阻害薬)、Ledipasvir (NS5a 阻害薬)、Sofosbuvir (NS5b 阻害薬)を用いた。感染中和抗体の反応性については 2 クローンと JFH1 株で大きな違いはなかった。DAA の効果については Sofosbuvir については JFH1 と違いはなかったが、Simeprevir、Ledipasvir では JFH1 株よりそれぞれ約 50 倍、約 30 倍低い濃度の EC50 値を示した。本実験で樹立した感染性 ED43 クローンを用いることで、新規 DAA の 4 型への効果が解析可能になった。

[渡邊則幸、鈴木貴也、相崎英樹、村松正道、脇田隆宇]

#### (27) E2 モノクローナル抗体の性状解析

E2-ferritin 融合タンパク質を抗原として樹立した E2 抗体の性状解析を行った。樹立した 4 種類のハイブリドーマの中で 2 種類については抗体産生量、また抗原との反応性が高いことからこれらの産生する 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った。更にそのうちの1つはウイルス感染を阻害した。今後は欠損変異型 E2、E2 ペプチドを用いることで、これらの抗体の結合領域を特定する。

[吉田南風、渡邊則幸、相崎英樹、村松正道、脇田隆字]

#### (28) Jc1-Gluc Δ9AA の性状解析

我々は分泌型ルシフェラーゼ Gluc を p7-NS2 間に挿入したキメラウイルス Jc1-Gluc Δ9AA を樹立し、Gluc の分泌配列内の 9 アミノ酸欠損がウイルス産生を上昇させることを明らかにした。この欠損によるウイルス産生の上昇は p7-Gluc 間の切断効率の上昇が要因であると考え、欠損を含む p7-Gluc 発現プラスミドを構築して切断への影響を解析した。その結果、野生型と比べて 9、16 アミノ酸欠損型で p7-Gluc 間の切断効率の上昇が観察された。Gluc の挿入は機能する p7 の産生を減少させるが、欠損が切断効率を改善させることでウイルス産生が上昇するようである。

[佐藤李香、渡邊則幸、相崎英樹、村松正道、脇田隆字]

#### (29) 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

樹立したキメラウイルス Jc1-Gluc Δ9AA を用いて、ウイルスの生活環に影響を及ぼす宿主因子のスクリーニングを行った。ウイルスはその増殖過程で細胞膜を含む、膜領域を利用することから、本実験ではイオンチャネルをターゲットとした siRNA ライブラリーを用いた。スクリーニングの結果、338 遺伝子のうち 11 遺伝子において上清中のルシフェラーゼ活性の減少が確認された。更に、11 種類のうちの 6 種類はカリウムチャネルであった。現在、カリウムチャネルを含む上位 4 種のイオンチャネルに注目し解析を進めている。

[佐藤李香、渡邊則幸、相崎英樹、村松正道、脇田隆字]

### 4. E 型肝炎ウイルス (HEV) に関する研究

#### (1) 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。その結果、ウイルス複製阻害活性を持つ低分子化合物の一部に共通の作用機序が存在することを見出した。この低分子化合物の機能から 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、吉崎佐矢香、石井孝司(品質保証・管理部)、鈴木亮介、脇田隆字、村松正道]

#### (2) キナーゼ siRNA ライブラリーを用いた HEV 複製に関与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ている。その結果、ウイルス複製に関与するキナーゼ候補が複数見つかった。

[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]

#### (3) リバーズジェネティクス法を用いた rabbit HEV 感染クローンの作製

本研究では、in vitro で合成したキャップ構造を持つ全長 rabbit HEV RNA をヒト肝癌細胞 PLC/PRF/5 にトランスフェクションし、ウイルスの作製を試みた。トランスフェクション後、経時的に培養上清を採取し、ウイルス抗原と RNA を ELISA および RT-PCR により測定し、ウイルス増殖を確認した。さらに培養上清をウサギに接種し、ウサギの血清及び糞便から rabbit HEV が検出された。以上の結果はリバーズジェネティクス法を用いた rabbit HEV の作製が成功したことが示唆された。

[張文静(中国山東省血液センター)、李天成、吉崎佐矢香、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]

#### (4) ウサギにおける HEV の感染性及び病原性の研究

Rabbit HEV 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されていない。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路で接種し、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。これまでの結果は Rabbit HEV がウサギに肝炎を引き起こす可能性が示唆された。

[張文静(中国山東省血液センター)、李天成、吉崎佐矢香、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]

#### (5) Rabbit E 型肝炎ウイルス様粒子の作製およびその応用

Rabbit HEV はウサギから検出された新型 HEV であり、G3 に分類されているにもかかわらず、ヒト由来 G3 HEV に異なる宿主を持っている。Rabbit HEV 抗原性解析のため、本研究では Rabbit HEV の構造蛋白を組換えバキュロウイルスで発現し、ウイルス様粒子の作成を試みた。N 末端 13aa あるいは 111aa を欠失した rabbit 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、ウイルス様粒子(HEV-LPs)の作製に成功した。Rabbit HEV-LPs を用いて抗体検出 ELISA 法を樹立した。Rabbit HEV の抗原性は従前既知の G1, G3, G4 G5, G6, DcHEV の抗原性と類似している。現在、Rabbit HEV-LPs をウサギに免疫して誘導された抗体の感染防御効果を評価の上、ワクチンの開発を検討している。

[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)、脇田隆宇、村松正道]

#### (6) 牛、羊における HEV 感染の調査

最近、牛や羊などの家畜から HEV が感染され、そのミルクからも HEV が検出された報告があった。牛や羊などにおける HEV の感染状況を把握するのは重要である。日

本と中国から牛と羊の血清を採取し、抗体及び HEVRNA を検査し、HEV の感染実態を明らかにする。これまでの結果では牛から HEV 陽性例がまだ見つからなかったが、羊から抗体陽性検体が存在する。今、サンプルを採取し、HEVRNA の検査を検討している。

[李天成、白慧敏、柯昌文(中国広東 CDC)、村松正道]

#### (7)台湾の六ヶ月齢の出荷直前の豚における HEV 感染調査

豚由来の HEV 感染リスクの評価の一環として台湾の 8 つの郡の 30 の養豚場で飼育された 6 ヶ月齢のブタから 295 の糞便サンプルを集め HEV RNA を測定した。その結果、25.1% (74/295) の糞便は HEV RNA が陽性だった。さらに 74 の HEV RNA 陽性サンプルを用いて RT-PCR を実施し、増幅された 16 株の塩基配列を解析した。その中、2 株は G3a、14 株は G4b に属する。NGS 解析により二株の G4b 全長配列が得られた。この結果は G3 と G4 HEV が台湾の養豚場で広がっていて、G4b が主な遺伝子型であることが明らかになった。出荷直前の豚から HEV が検出されたことから豚からヒトへの感染リスクが再確認され、豚肉及びその関連食物を十分に加熱する必要である。

[Fengmei Yang、Zhanlong He(中国昆明中国医学科学院)、吉崎佐矢香、武田直和(大阪大学)、脇田隆宇、村松正道、李天成]

#### (8) アカゲザルにおける HEV 感染状況調査

アカゲザルにおける HEV 感染症の現状を調査するために、我々は中国のアカゲザルファームから 548 検体の血清と 48 検体の糞便サンプルを採取し、抗 HEV IgG 抗体と HEV RNA を調べた。388 頭(70.8%)のアカゲザルは抗 HEV IgG 抗体が陽性であった。1 才と 2 才のサルでは抗体の陽性率は 7.4%で、それに対して 3 年以上のサルの感染率は 82.6%だった。二歳のサル血清から G4b、三才サル糞便から G4h に属する HEV RNA が検出された。この結果は 2 つの遺伝子型の異なる HEV 株がこのアカゲザルファームで広がっていたことが示唆された。ただし、これらのサルは明らかな臨床症状を示さなかった。HEV 感染

源の特定及びアカゲザルにおける HEV の病原性を評価するため更なる研究は求められる。

[呉芳姿(台湾 CDC)、白慧敏、吉崎佐矢香、団海燕、武田直和(大阪大学)、村松正道、李天成]

#### (9) E 型肝炎の発生動向調査

日本における 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ている。2018 年の E 型肝炎報告数は 442 件のうち、64 検体の遺伝子解析を行った。その内訳は遺伝子型 1: 3.1%、遺伝子型 3: 92.2%、遺伝子型 4: 4.7%であった。国内での流行は主に遺伝子型 3 であるが、得られた遺伝子配列から各症例は広域的な散発例と考えられた。

[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) ヒトポリオーマウイルス New Jersey polyomavirus (NJPyV)のウイルス様粒子の作製及びその応用

NJPyV はヒトポリオーマウイルスの一つである。VP1 は主要なBKVの構造蛋白をコードする。NJPyV VP1を発現する組換えバキュロウイルスを昆虫細胞 Sf9 と Tn5 に感染し、大きさが異なる二種類の BKV 様粒子 (NJPyV -LPs) (直径 20 nm と 50 nm) を得た。NJV-LPs を用いて抗体検出法を樹立し、健常日本人における抗体の保有状況を調査した。その結果、日本人における NJPyV に対する抗体の保有率 (1.8%) が低く、NJPyV は日本に常在するウイルスでないことが示唆された。

[周頭鳳、白慧敏、片岡紀代(感染病理部)、村松正道、鈴木哲朗(浜松医大)、李天成]

##### (2) フラビウイルス感染におけるシアル酸を含む糖鎖の関与

一回感染性フラビウイルスを用いて、ウイルス感染初期過程におけるシアル酸を含む糖鎖の関与を調べた。糖鎖のシアル酸付加に重要な SLC35A1、SLC35A2 遺伝子ノックアウト細胞は、コントロール細胞と比較してデングウイ

ルス、ジカウイルス、日本脳炎ウイルス、黄熱ウイルスの感染が低下した。ノイラミニダーゼ処理した細胞でもフラビウイルスの感染が減弱したことから。シアル酸を含む糖鎖は、フラビウイルスの細胞侵入に関与している可能性が考えられた。

[松田麻未、鈴木亮介]

#### 発表業績一覧

##### I. 誌上発表

##### 1. 欧文発表

- 1) Athiyah AF, Utsumi T, Wahyuni RM, Dinana Z, Yamani LN, Soetjipto, Sudarmo SM, Ranuh RG, Darma A, Juniastuti, 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, 2019
- 2) Bai H, Shiota T, Yoshizaki S, Saito-Obata M, Malbas FF Jr, Lupisan SP, Oshitani H, Takeda N, Muramatsu M, Wakita T, Ishii K, Li TC. Detection of Subgenotype IA and IIIA Hepatitis A Viruses in Rivers Flowing through Metro Manila, the Philippines. 2018. *Jpn J Infect Dis.* 72:53-55. (2019)
- 3) Bauri M, Wilkinson AL, Ropa B, Feldon K, Snider CJ, Anand A, Tallis G, Boualam L, Grabovac V, Avagyan T, Reza MS, Mekonnen D, Zhang Z, Thorley BR, Shimizu H, Apostol LNG Takashima Y. Notes from the Field: Circulating Vaccine-Derived Poliovirus

- Type 1 and Outbreak Response - Papua New Guinea, 2018. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 68: 119-120, 2019
- 4) Brickley EB, Wieland-Alter W, Connor RI, Ackerman ME, Boesch AW, Arita M, Weldon WC, O’Ryan MG, Bandyopadhyay AS, Wright PF. Intestinal Immunity to Poliovirus Following Sequential Trivalent Inactivated Polio Vaccine/Bivalent Oral Polio Vaccine and Trivalent Inactivated Polio Vaccine-only Immunization Schedules: Analysis of an Open-label, Randomized, Controlled Trial in Chilean Infants. *Clinical Infectious Diseases*, 67: S42-S50, 2018
- 5) Cooper G, Mao Q, Cawt L, Wang Y, Dougall T, Rigsby P, Liang Z, Xu M, Collaborative Study G, Minor P, Wang J Martin J. Establishment of the 1st WHO International Standard for anti-EV71 serum (Human). [Shimizu H, contributed as one of the Collaborative Study Group members] . *Biologicals* 53: 39-50, 2018
- 6) Deng L, Gan X, Ito M, Chen M, Aly HH, Matsui C, Abe T, Watashi K, Wakita T, Suzuki T, Okamoto T, Matsuura Y, Mizokami M, Shoji I, Hotta H. Peroxiredoxin 1, a Novel HBx-Interacting Protein, Interacts with Exosome Component 5 and Negatively Regulates Hepatitis B Virus (HBV) Propagation through Degradation of HBV RNA. *J Virol*. Mar 5;93(6); e02203-18 (2019).
- 7) 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
- 8) 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.
- 9) Fujii K, Sudaka Y, Takashino A, Kobayashi K, Kataoka C, Suzuki T, Iwata-Yoshikawa N, Kotani O, Ami Y, Shimizu H, Nagata N, Mizuta K, Matsuzaki Y, Koike S. VP1 amino acid residue 145 of enterovirus 71 is a key residue for its receptor attachment and resistance to neutralizing antibody during cynomolgus monkey infection. *J Virol* May 2018
- 10) Fukano K<sup>+</sup>, Tsukuda S<sup>+</sup>, Watashi K, Wakita T. Concept of Viral Inhibitors via NTCP. *Semin Liver Dis*. 2019. 39(1): 78-85. (<sup>+</sup>equally contributed)
- 11) Fukano K, Tsukuda S, Oshima M, Suzuki R, Aizaki H, Ohki M, Park SY, Muramatsu M, Wakita T, Sureau C, Ogasawara Y, Watashi K. Troglitazone impedes the oligomerization of sodium taurocholate cotransporting polypeptide and entry of hepatitis B virus into hepatocytes. *Front Microbiol*. 2019. 8; 9: 3257.
- 12) Funakoshi Y, Ito K, Morino S, Kinoshita K, Morikawa Y, Kono T, Doan YH, Shimizu H, Hanaoka N, Konagaya M, Fujimoto T, Suzuki A, Chiba T, Akiba T, Tomaru Y, Watanabe K, Shimizu N, Horikoshi Y. Enterovirus D68 respiratory infection in a children's hospital in Japan in 2015. *Pediatr Int*. 2019.
- 13) Hu J, Lin YY, Chen PJ, Watashi K, Wakita T. Cell and animal models for studying hepatitis B virus

- infection and drug development. *Gastroenterology* 156(2): 338-354 (2019)
- 14) Imagawa T, Sugiyama R, Shiota T, Li TC, Yoshizaki S, Wakita T, Ishii K. Evaluation of Heating Conditions for Inactivation of Hepatitis E Virus Genotypes 3 and 4. *J Food Prot.* 81:947-952 (2018)
- 15) 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)
- 16) 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
- 17) Kato T, Hasegawa M, Yamamoto T, Miyazaki T, Suzuki R, Wakita T, Suzuki T, Park EY. Expression of a functional intrabody against hepatitis C virus core protein in *Escherichia coli* and silkworm pupae. *Protein Expr Purif.* 150:61-66 (2018)
- 18) 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)
- 19) Kitagawa K, Nakaoka S, Asai Y, Watashi K, Iwami S. A PDE multiscale model of hepatitis C virus infection can be transformed to a system of ODEs. *J Theor Biol* 448: 80-85 (2018)
- 20) Kitamura K, Que L, Shimadu M, Koura M, Ishihara Y, Wakae K, Nakamura T, Watashi K, Wakita T, Muramatsu M. Flap endonuclease 1 is involved in cccDNA formation in the hepatitis B virus. *PLoS Pathog* 14(6): e1007124 (2018)
- 21) Li TC, Bai H, Yoshizaki S, Ami Y, Suzaki Y, Doan YH, Takahashi K, Mishiro S, Takeda N, Wakita T. Genotype 5 Hepatitis E Virus Produced by a Reverse Genetics System Has the Potential for Zoonotic Infection. *Hepatology Communications.* 1: 160–172. (2019)
- 22) Matsuda M, Yamanaka A, Yato K, Yoshii K, Watashi K, Aizaki H, Konishi E, Takasaki T, Kato T, Muramatsu M, Wakita T, Suzuki R. High-throughput neutralization assay for multiple flaviviruses based on single-round infectious particles using dengue virus type 1 reporter replicon. *Sci Rep.* Nov 9;8(1):16624 (2018).
- 23) Momose H, Matsuoka S, Murayama A, Yamada N, Okuma K, Ikebe E, Hoshi Y, Muramatsu M, Wakita T, Toyota K, Kato T, Hamaguchi I. Evaluation of in vitro screening and diagnostic kits for hepatitis C virus infection. *J Clin Virol.* 105: 97-102 (2018).
- 24) Murayama A, Fujiwara K, Yamada N, Shiina M, Aly HH, Masaki T, Muramatsu M, Wakita T, Kato T. Evaluation of antiviral effects of novel NS5A inhibitors in hepatitis C virus cell culture system with full-genome infectious clones. *Antivir Res.* 158: 161–170 (2018).

- 25) Murayama A, Saitoh H, Takeuchi A, Yamada N, Matsumura T, Shiina M, Muramatsu M, Wakita T, Kato T. Vitamin D derivatives inhibit hepatitis C virus production through the suppression of apolipoprotein. *Antivir Res*. Dec;160:55-63 (2018).
- 26) Naito Y, Hamada-Tsutsumi S, Yamamoto Y, Yoshioka Y, Watashi K, Ochiya T, Tanaka Y. Screening of microRNAs for a repressor of hepatitis B virus replication. *Oncotarget* 9(52): 29857-29868 (2018)
- 27) Nio Y, Akahori Y, Okamura H, Watashi K, Wakita T, Hijikata M. Inhibitory effect of fasiglifam on hepatitis B virus infections through suppression of the sodium taurocholate cotransporting polypeptide. *Biochem Biophys Res Commun* 501: 820-825 (2018)
- 28) Ohashi H, Nishioka K, Nakajima S, Kim S, Suzuki R, Aizaki H, Fukasawa M, Kamisuki S, Sugawara F, Ohtani N, Muramatsu M, Wakita T and Watashi K. The aryl hydrocarbon receptor–cytochrome P450 1A1 pathway controls lipid accumulation and enhances the permissiveness for hepatitis C virus assembly. *J Biol Chem*. 293(51): 19559-19571. (2018)
- 29) Oka T, Iritani N, Yamamoto SP, Mori K, Ogawa T, Tatusmi C, Shibata S, Harada S, Wu FT. Broadly reactive real-time reverse transcription-polymerase chain reaction assay for the detection of human sapovirus genotypes. *J Med Virol*. 91(3):370-377, 2019.
- 30) 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 & Development* 2019
- 31) Passioura T, Watashi K, Fukano K, Shimura S, Saso W, Morishita R, Ogasawara Y, Tanaka Y, Mizokami M, Sureau C, Suga H, Wakita T. De Novo Macrocyclic Peptide Inhibitors of Hepatitis B Virus Cellular Entry. *Cell Chem Biol* 25(7): 906-915 (2018)
- 32) Saso W, Tsukuda S, Ohashi H, Fukano K, Morishita R, Matsunaga S, Ohki M, Ryo A, Park SY, Suzuki R, Aizaki H, Muramatsu M, Sureau C, Wakita T, Matano T, Watashi K. A new strategy to identify hepatitis B virus entry inhibitors by AlphaScreen technology targeting the envelope-receptor interaction. *Biochem Biophys Res Commun*. 501(2):374-379 (2018)
- 33) Sato H, Tanaka-Taya K, Shimizu H, Goto A, Tanaka S, Nakano T, Hotta C, Okazaki T, Itamochi M, Ito M, Okamoto-Nakagawa R, Yamashita Y, Arai S, Okuno H, Morino S, Oishi K. Polio vaccination coverage and seroprevalence of poliovirus antibodies after the introduction of inactivated poliovirus vaccines for routine immunization in Japan. *Vaccine* 37: 1964-1971, Mar 2019
- 34) Shiromoto F, Aly HH, Kudo H, Watashi K, Murayama A, Watanabe N, Zheng X, Kato T, Chayama K, Muramatsu M, Wakita T. IL-1b/ATF3-mediated induction of Ski2 expression enhances hepatitis B virus x mRNA degradation. *Biochem Biophys Res Commun* 503(3): 1854-1860 (2018)

- 35) Suzuki Y, Doan YH, Kimura H, Shinomiya H, Shirabe K, Sakon and Katayama K. Predicting directions of changes in genotype proportions between norovirus seasons in Japan. *Front Microbiol.* 2019
- 36) Takahashi S, Metcalf CJE, Arima Y, Fujimoto T, Shimizu H, Rogier van Doorn H, Le Van T, Chan YF, Farrar JJ, Oishi K Grenfell BT. Epidemic dynamics, interactions and predictability of enteroviruses associated with hand, foot and mouth disease in Japan. *Journal of the Royal Society, Interface* 152018. 2018
- 37) Takeuchi M, Fukushima W, Nakano T, Inui M, Ohfuji S, Kase T, Ito K, Kondo K, Maeda A, Shimizu H, Hirota Y. Nationwide Survey on Pediatric Inpatients of Hand, Foot and Mouth Disease, Herpangina, and Associated Complications during Epidemic Period in Japan: Estimated Number of Patients and Factors Associated with Severe Cases. *J Epidemiol* 2018
- 38) Takeuchi F, Ikeda S, Tsukamoto Y, Iwasawa Y, Qihao C, Otakaki Y, Ryota O, Yao WL, Narita R, Makoto H, Watashi K, Wakita T, Takeuchi K, Chayama K, Kogure A, Kato H, Fujita T. Screening for inhibitor of episomal DNA identified dicumarol as a hepatitis B virus inhibitor. *PLoS One* 14(2): e0212233 (2019)
- 39) Thongprachum A, Fujimoto T, Takanashi S, Saito H, Okitsu S, Shimizu H, Khamrin P, Maneekarn N, Hayakawa S, Ushijima H. Detection of nineteen enteric viruses in raw sewage in Japan. *Infect Genet Evol.* 63: 17-23, 2018
- 40) Tsukamoto Y, Ikeda S, Uwai K, Taguchi R, Chayama K, Sakaguchi T, Narita R, Yao WL, Takeuchi F, Otakaki Y, Watashi K, Wakita T, Kato H, Fujita T. Rosmarinic acid is a novel inhibitor for Hepatitis B virus replication targeting viral epsilon RNA-polymerase interaction. *PLoS One* 13(5): e0197664 (2018)
- 41) Ueno M, Nogawa M, Siddiqui R, Watashi K, Wakita T, Kato N, Ikeda M, Okimura T, Isaka S, Oda T, Ariumi Y. Acidic polysaccharides isolated from marine algae inhibit the early step of viral infection. *Int J Biol Macromol* 124: 282-290 (2018)
- 42) Utsumi T, Wahyuni RM, Doan YH, Dinana Z, Soegijanto S, Fujii Y, Juniastuti, Yamani LN, Matsui C, Deng L, Abe T, Soetjipto, Lusida MI, Ishii K, Shimizu H, Katayama K, Shoji I. Equine-like G3 rotavirus strains as predominant strains among children in Indonesia in 2015-2016. *Infect Genet Evol.* 61:224-228, 2018.
- 43) Wakae K, Nishiyama T, Kondo S, Izuka T, Que L, Chen C, Kase K, Kitamura K, Mohiuddin M, Wang Z, Ahasan MM, Nakamura M, Fujiwara H, Yoshizaki T, Hosomochi K, Tajima A, Nakahara T, Kiyono T, Muramatsu M. Keratinocyte differentiation induces APOBEC3A, 3B, and mitochondrial DNA hypermutation *Sci Rep.* 2018 Jun 27;8(1):9745. doi: 10.1038/s41598-018-27930-z
- 44) Wang B, Ogata H, Takishima Y, Miyamoto S, Inoue H, Kuroda M, Yamada K, Hijikata Y, Murahashi M, Shimizu H, Okazaki T, Nakanishi Y Tani K. A Novel Combination Therapy for Human Oxaliplatin-resistant Colorectal Cancer Using

- Oxaliplatin and Coxsackievirus A11. Anticancer Research 38: 6121-6126, 2018
- 45) Yasuura M, Shirato H, Higo-Moriguchi K, Fujimaki M. Detection of norovirus-like particles with an external force-assisted near-field illumination biosensor. Japanese Journal of Applied Physics, 58, 071005-1-071005-5, 2019. 25)
- 46) Yamane D, Feng H, Rivera-Serrano EE, Selitsky SR, Hirai-Yuki A, Das A, McKnight KL, Misumi I, Hensley L, Lovell W, Gonzalez-Lopez 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. 7:1096-1104. (2019)
- 47) Yang F, Duan S, Guo Y, Li Y, Yoshizaki S, Takeda N, Wakita T, Muramatsu M, Zhao Y, He Z, Li TC. Current status of hepatitis E virus infection at a rhesus monkey farm in China. Vet Microbiol. 230:244-248. (2019)
2. 和文発表
- 1) 芦塚由紀、板持雅恵、伊藤雅、大沼正行、小澤広規、梶原香代子、葛口 剛、熊田裕子、後藤明子、高橋雅輝、筒井理華、中田恵子、中野守、西澤佳奈子、濱島洋介、堀田千恵美、三好龍也、諸石早苗、吉田弘 平成29年度ポリオ環境水サーベイランス(感染症流行予測調査事業および調査研究)にて検出されたエンテロウイルスについて. 病原体検出情報 40: 88-90, 2019
- 2) 杉山 隆一、脇田 隆宇 ウイルス性肝炎の発症機構 最新医学別冊 診断と治療の ABC142 ウイルス性肝炎, 最新医学社, 142: 35-46, 2019
- 3) 清水博之 「エンテロウイルス (ポリオウイルスを含む)」の項を担当、147-156、ウイルス検査法、日本臨床ウイルス学会、2018
- 4) 清水博之 エンテロウイルスD68のウイルス学的性状. 神経感染症学雑誌 23,62-66, 2018
- 5) 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
- 6) 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
- 7) 清水博之 世界ポリオ根絶は本当に達成できるのか? 現状と課題. 臨床とウイルス 46, 285-295, 2018
- 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) 染谷雄一、清水博之 ポリオワクチンとポリオウイルスのバイオリスク管理、ウイルス(日本ウイルス学会) 68(1), 31-40, 2018.
- 10) 中野貴司、清水博之 「ポリオワクチン」の項を担当、ワクチン— 基礎から臨床まで —、112-123、日本ワクチン学会、2018
- 11) 調恒明、江原勇登、大友麗、貞升健志、高橋雅輝、竹内道子、筒井理華、豊嶋千俊、濱崎光宏、杉岡由美子、横井一、吉田弘、 「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」平成30年度厚生労働科学研究費補助金(新興・再興感染症及び予防接種政策推進研究事業)「国内の病原体サーベイランスに資する機能的なラボネットワークの強化に関する研究」分担研究報告書,2018(その他ガイドライン)

- 12) 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
- 13) 藤本嗣人、小長谷昌未、花岡希、清水博之 エンテロウイルス実験室診断の現状と課題。病原微生物検出情報 39: 98-99, 2018

## II. 学会発表

### 1. 国際学会

- 1) Shimizu H. NIID Polio GSL activity. The 8rd Meeting on Vaccine-preventable Diseases Laboratory Networks in the Western Pacific Region. 20-21 March, 2019, Manila
- 2) Shimizu H. Contingency planning in polio free region; Experience from NIID. The 8rd Meeting on Vaccine-preventable Diseases Laboratory Networks in the Western Pacific Region. 20-21 March, 2019, Manila
- 3) Shimizu H. PEFs within the GPLN NIID experience. Third meeting of the Ad Hoc Small Working Group of the GPLN (2018). 6-8 November 2018, Paris
- 4) Shimizu H. NIID Update. The 22th Polio Research Committee Meeting. 15-16 October, 2018, Evanston, IL.
- 5) Shimizu H. Challenges in detecting VDPV- Examples from Laos and PNG -, Second meeting of the Ad Hoc Small Working Group of the GPLN, 27-29 June 2018, De Biltse Hoeck
- 6) Shimizu H. NIID Update. The 21th Polio Research Committee Meeting, 4 May, 2018, Geneva
- 7) Aly HH, Chayama K, Wakita T. Post-Transcriptional Regulation of Hepatitis B Virus (HBV) x mRNA Degradation and Its Potential As a New Anti-HBV Approach. The Liver Meeting 2018, AASLD's Annual Meeting. Nov. 9-13, 2018, San Francisco, USA.
- 8) Fukano K, Tsukuda S, Ohki M, Park SY, Suzuki R, Aizaki H, Muramatsu M, Wakita T, Ogasawara Y, Watashi K. Oligomerization of NTCP induces hepatitis B virus internalization. 2018 International HBV Meeting. 2018/10/3-6. Taormina (Italy).
- 9) Kotani O, Yokoyama M, Fujii K, Kobayashi K, Nishimura Y, Nagata N, Shimizu H, Koike S, Sato H. Cis-allosteric regulation of the interaction surfaces of enterovirus A71 capsid protein by the VP1 single amino acid residue at position 145. Europic 2018, 3-7 June, 2018, Egmond aan Zee
- 10) Matsuda M, Yamanaka A, Yoshii K, Watashi K, Aizaki H, Konishi E, Takasaki T, Muramatsu M, Wakita T, Suzuki R. Neutralization assay for multiple flaviviruses based on single-round infectious reporter particles. 37th American Society for Virology Annual Meeting. Maryland, USA, 2018. 7. 14-18.
- 11) Miyazaki M, Saito H, Shibata C, Yen DH, Arao Y, Iwata-Yoshikawa N, Hasegawa H, Shimizu H, Nagata N. Development of a flaccid paralysis mouse model after infection with enterovirus D68. Europic 2018, 3-7 June, 2018, Egmond aan Zee
- 12) Murakami K, Tenge VR, Karandikar U, Ramani S, Ettayebi K, Crawford SE, Zeng XL, Neill FH, Atmar RL, Estes MK. Evaluation of the bile-driven replication of

GII.3 human norovirus in human intestinal enteroids. American Society for Virology, 2018 July 14-18, College Park, Maryland, USA.

13) Murayama A, Fujiwara K, Yamada N, Shiina M, Muramatsu M, Wakita T, Kato T. Evaluation of Antiviral Effects of Second-generation NS5A Inhibitor in Hepatitis C Virus Cell Culture System with Full-genome Infectious Clones. The Liver Meeting 2018, AASLD's Annual Meeting. Nov. 9-13, 2018, San Francisco, USA.

14) Murayama A, Hikita H, Yamada N, Shiina M, Muramatsu M, Wakita T, Takehara T, Kato T. In Vitro Evaluation of P32 Deletion in Hepatitis C Virus NS5A for Viral Replication and Susceptibility to Antiviral Reagents. The Liver Meeting 2018, AASLD's Annual Meeting. Nov. 9-13, 2018, San Francisco, USA.

15) Murayama A, Yamada N, Murata K, Shiina M, Muramatsu M, Wakita T, Kato T. Evaluation of anti-HBV effects by administration of interferon lambda3. 2018 International Meeting, Molecular Biology of Hepatitis B Virus. Oct. 3-6, 2018, Taormina, Italy.

16) Nagata N, Iwata-Yoshikawa N, Doan YH, Shimizu H, Hasegawa H. Pathogenicity of recent Coxsackievirus B2 isolates in adult mice. EuroPic 2018, The Netherlands 3-7 June, 2018, Egmond aan Zee

17) Nitta S, Kato T, Tuchiya J, Inoue-Shinomiya E, Sato A, Tsunoda T, Miyoshi M, Kawai-Kitahata F, Murakawa M, Itsui Y, Azuma S, Nakagawa M, Kakinuma S, Asahina Y. The characteristic and the anti-HCV reagents susceptibility analysis of NS5A Resistance-Associated Substitutions (RAS) detected after DAA treatment failure patients. The Liver Meeting 2018, AASLD's Annual Meeting. Nov. 9-13, 2018, San Francisco, USA.

18) Nitta S, Kato T, Tuchiya J, Inoue-Shinomiya E, Sato A,

Tsunoda T, Miyoshi M, Kawai-Kitahata F, Murakawa M, Itsui Y, Azuma S, Nakagawa M, Kakinuma S, Asahina Y. The in vitro analysis of NS5A resistance-associated substitutions (RAS) observed in DAA treatment failure patients. 25th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Oct. 8-11, 2018, Dublin, Ireland.

19) Ohashi H, Nakajima S, Kim S, Suzuki R, Aizaki H, Fukasawa M, Kamisuki S, Sugawara F, Ohtani N, Muramatsu M, Wakita T, Watashi K. Aryl hydrocarbon receptor-cytochrome p450 1a1 pathway regulates hepatic lipid biosynthesis to maximize hepatitis C virus production. 25<sup>th</sup> International Symposium on Hepatitis C virus and Related viruses. 2018.10.8-11 Dublin (Ireland). Oral presentation

20) Oka T. Development of an improved RT-qPCR assay for human sapovirus detection. 第15回日台シンポジウム、2018年9月4日、台湾(台北)

21) Saso W, Tsukuda S, Ohashi H, Fukano K, Morishita R, Matsunaga S, Ohki M, Ryo A, Park SY, Suzuki R, Aizaki H, Muramatsu M, Sureau C, Wakita T, Matano T, Watashi K. AlphaScreen assay targeting the LHBs-NTCP interaction identified rapamycin and its derivatives as novel hepatitis B virus entry inhibitors. 2018 International HBV Meeting The Molecular Biology of Hepatitis B Viruses. 2018/10/3-6. Taormina (Italy). ポスター発表

22) Sato R, Watanabe N, Aly HH, Koyanagi M, Arimura Y, Aizaki H, Muramatsu M, Wakita T. Construction of chimeric reporter HCV with efficient production capacity. 25th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. 2018.10.8-11 Dublin (Ireland). ポスター発表

23) Shiina M, Murayama A, Yamada N, Muramatsu M, Wakita T, Imawari M, Kato T. HBV genotype affects

vulnerability of host cells against NK cell-associated immune attack. 2018 International Meeting, Molecular Biology of Hepatitis B Virus. Oct. 3-6, 2018, Taormina, Italy.

24) Shimizu H. A cluster of cases with acute flaccid myelitis coincident with an enterovirus D68 outbreak in Japan, 2015 A respiratory “neurovirulent”? enterovirus. International Workshop on Laboratory Diagnosis for Enterovirus, 23 April, 2018, Taipei

25) Shimizu H. An Outbreak of Enterovirus D68 in August–December 2015 in Japan as an emerging “neurovirulent” enterovirus infection, Lessons Learned since 1998 Enterovirus A71 Epidemic in Taiwan Contributions and Implications, 29 September, 2018, Taipei

26) Suzuki T, Muramatsu M., Wakita T. Activation of protein kinase R by hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase. *Virology*. 529:226-233. (2019)

27) Suzuki T, Okamoto T, Katoh H, Sugiyama Y, Kusakabe S, Tokunaga M, Hirano J, Miyata Y, Fukuhara T, Ikawa M, Satoh T, Yoshio S, Suzuki R., Saijo M, Huang DCS, Kanto T, Akira S, Matsuura Y. Infection with flaviviruses requires BCLXL for cell survival. *PLoS Pathog.* 14:e1007299 (2018)

28) Uotani T, Murakami K., Uchida T, Tanaka S, Nagashima H, Zeng X L, Akada J, Estes MK, Graham DY, Yamaoka Y. Two Dimensional Human Gastric Organoid Model of Helicobacter Pylori Infection. Digestive Disease Week 2018, June 2-5, 2018, Washington, DC, USA.

29) Watanabe N., Suzuki T., Date T, Su Su Hmwe., Aly HH., Aizaki H., Sugiyama M, Mizokami M, Mohamed El K, Ashraf T, William IV D, Guofeng C, Muramatsu M,

Wakita T. Establishment of infectious genotype 4 HCVcc. 25th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. 2018.10.8-11 Dublin (Ireland). ポスター発表

30) Watanabe N., Suzuki T., Date T, Su Su Hmwe., Aly HH., Aizaki H., Sugiyama M, Mizokami M, Mohamed El K, Ashraf T, William IV D, Guofeng C, Muramatsu M, Wakita T. Establishment of infectious genotype 4 HCVcc. The Liver Meeting 2018. 2018.11.9-13 San Francisco (USA). ポスター発表

31) Yato K., Matsuda M., Watanabe N., Nakajima S., Fujimoto A, Watashi K., Aizaki H., Kato T., Tamura K, Muramatsu M., Wakita T., Suzuki R. Flavivirus subviral particles-based DNA vaccine induces neutralizing antibodies against HCV. 25th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Oct. 8-11, 2018, Dublin, Ireland.

## 2 国内学会

1) 白土東子 感染症と糖鎖、TIA ナノバイオサマースクール、平成 30 年 9 月、東京

2) 白土東子 ノロウイルスと血液型抗原、第 4 回コンソーシアム技術セミナー・技術交流会、平成 30 年 11 月、東京

3) Oka T., Iritani N, Yamamoto SP, Mori K, Ogawa T, Tatsumi C, Shibata S, Harada S, Wu FT. Development of a Broader range human sapovirus real-time reverse transcription-polymerase chain reaction assay. 第 66 回日本ウイルス学会学術集会、平成 30 年 10 月 28-30 日、京都

4) 岡智一郎., 下池貴志., 高木弘隆 plasmid-based リバースジェネティクスコンストラクトのヒトサポウイルスへの応用、第 41 回日本分子生物学会、平成 30 年

11月29日、横浜

5) Murakami K, Tenge VR, Karandikar U, Ramani S, Ettayebi K, Zeng XL, Crawford SE, Katayama K, Atmar RL, Estes MK. 胆汁要求性 GII.3 ヒトノロウイルスのヒト小腸エンテロイドにおける複製メカニズムの解析、第 66 回日本ウイルス学会学術集会、平成 30 年 10 月 28-30 日、京都

6) 魚谷貴洋、村上耕介、内田智久、田中信吾、永島裕之、Zeng XL、赤田純子、Estes MK、Graham DY、山岡吉生 2 次元ヒト胃オルガノイドによる *Helicobacter pylori* 感染実験モデル: 病原因子の役割も含めて、第 24 回日本ヘリコバクター学会学術集会、平成 30 年 6 月 29 日-7 月 1 日、大分

7) Fujii Y, Someya Y, Muramatsu M, Katayama K. A rotavirus genotyping method with the multiplex-PCR adapted for recent epidemic strains (新規流行株に対応した multiplex-PCR によるロタウイルスの遺伝子型別法)、第 66 回日本ウイルス学会学術集会、平成 30 年 10 月 28-30 日、京都

8) Akane Y, Tsugawa T, Yoto Y, Kondo K, Fujii Y. The characterization of human rotavirus equine-like G3P[8] strains emerged in Tomakomai, 2016. (2016 年の苫小牧で地域的な流行を認めた Equine-like G3P[8] 株の解析)、第 66 回日本ウイルス学会学術集会、平成 30 年 10 月 28-30 日、京都

9) 染谷雄一、清水博之 ポリオワクチンと GAPIII、第 30 回微生物シンポジウム、平成 30 年 7 月 27-28 日、東京

10) 清水博之 急性弛緩性麻痺のポリオウイルス検査。2018 年度 希少感染症診断技術研修会、東京、2019 年 2 月 19 日

11) 清水博之 世界ポリオ根絶計画の進捗と残された課題。第 19 回 医薬品等ウイルス安全性シンポジウム セッション 3 ワクチン・血液製剤、東京、2019 年 2 月 9 日

12) 清水博之 世界ポリオ根絶計画とポリオワクチン。知の市場・市民連携セミナー。東京、2018 年 12 月 4 日

13) 清水博之 世界ポリオ根絶は本当に達成できるのか? 現状と課題。第 59 回日本臨床ウイルス学会シンポジウム ウイルス感染症根絶の過去、現在、そして未来、大宮、2018 年 6 月 10 日

14) 清水博之 ポリオ根絶に向けた取り組み 第 28 回感染研シンポジウム、東京、2018 年 5 月 21 日

15) 吉田弘 「手足口病に関する外部精度管理調査結果について」平成 30 年度 地域保健総合推進事業 地全協九州支部レファレンスセンター連絡会議。平成 30 年 10 月 2-3 日。熊本市。招待講演及び講師

16) 吉田弘 「手足口病に関する外部精度管理調査結果について」平成 30 年度 地域保健総合推進事業 地全協中国四国支部レファレンスセンター連絡会議。平成 30 年 11 月 15 日。岡山市。招待講演及び講師

17) 有田峰太郎 ポリオウイルスの複製における脂質輸送機構の解析。第 60 回日本脂質生化学会、東京、2018. 6.1.

18) Yoshida K, Fujimoto T, Muramatsu M, Shimizu H. Prediction of dynamics of an epidemic of enterovirus infections by deep learning (ポスター)。第 29 回日本疫学会学術総会、東京、2019 年 1 月 30 日~2 月 1 日

19) 佐藤 弘、多屋馨子、大石和徳、清水博之 不活化ワクチン導入から現在までのポリオの予防接種状況・抗体保有状況の推移について。第 22 回日本ワクチン学会学術集

会、神戸、2018年12月8～9日

20) Yoshida K, Fujimoto T, Muramatsu M, Shimizu H. Prediction of a number of patients with hand, foot, and mouth disease by deep learning (ポスター). 第66回日本ウイルス学会学術集会, 京都、2018年10月28日～30日

21) Hung VM, Nguyen HTT, Anh NT, Anh DTH, Kataoka C, Taichiro T, Hasebe F, Thanh NTH, Shimizu H. Emerging Coxsackievirus A10, A4, and A2 Causing Hand, Foot and Mouth Disease in Vietnam, 2016-2017 (ポスター). 第66回日本ウイルス学会学術集会, 京都、2018年10月28日～30日

22) Saito H, Akino W, Sato H, Fujiya Y, Shibata C, Sato R, Shimizu H. Isolation of enterovirus D68 using suckling mice and the background. 乳飲みマウスによるエンテロウイルス D68 型の分離とその背景 (ポスター). 第66回日本ウイルス学会学術集会, 京都、2018年10月28日～30日

23) Nagata N, Iwata-Yoshikawa N, Doan YH, Shimizu H, Hasegawa H. Murine models of persistent infection by coxsackievirus B2 isolates. コクサッキーウイルス B2 分離株を用いた持続感染マウスモデル. 第66回日本ウイルス学会学術集会, 京都、2018年10月28日～30日

24) Kotani O, Yokoyama M, Fujii K, Kobayashi K, Nagata N, Shimizu H, Koike S, Sato H. Cis-allosteric regulation of the interaction surfaces of enterovirus A71 capsid protein by the VP1 single amino acid residue at position 145. VP1-145 アミノ酸によるエンテロウイルス A71 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. 第66回日本ウイルス学会学術集会, 京都、2018年10月28日～30日

25) 斎藤博之、柴田ちひろ、佐藤寛子、清水博之. エンテロウイルス D68 型の乳飲みマウスでの分離例. 第59回日

本臨床ウイルス学会、大宮、2018年6月10日

26) 吉田弘、後藤明子、筒井理華、堀田千恵美、小澤広規、西澤佳奈子、濱島洋介 わが国の環境水サーベイランスにて検出されたエンテロウイルス(2013-16年). 第77回日本公衆衛生学会総会. 郡山. 平成30年10月24-26日 (ポスター)

27) 後藤明子、吉田弘. 北海道における抗ポリオウイルス中和抗体保有状況調査(2011年～2017年). 第77回日本公衆衛生学会総会. 郡山. 平成30年10月24-26日 (ポスター)

28) 小澤広規、吉田弘. 横浜市における環境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77回日本公衆衛生学会総会. 郡山. 平成30年10月24-26日 (ポスター)

29) 西澤佳奈子、吉田弘. 長野県における環境水のエンテロウイルスサーベイランス. 第77回日本公衆衛生学会総会. 郡山. 平成30年10月24-26日 (ポスター) 第77回日本公衆衛生学会総会. 郡山. 平成30年10月24-26日 (ポスター)

30) 堀田千恵美、吉田弘. 環境水サーベイランスと感染症発生動向調査事業におけるエンテロウイルス属の検出状況. 第77回日本公衆衛生学会総会. 郡山. 平成30年10月24-26日 (ポスター)

31) 松岡由美子、吉田弘. 熊本市環境総合センターにおける検査の質確保について. 第77回日本公衆衛生学会総会. 郡山. 平成30年10月24-26日 (ポスター)

32) 松岡由美子、岩永貴代、杉谷和加奈、小畑裕子、西澤香織、近藤芳樹、芦塚由紀、濱崎光宏、丸山浩幸、橋実里、堤陽子、林徹、島崎裕子、松本一俊、八尋俊輔、酒井崇、深澤未来、松本文昭、松浦裕、濱田結花、御供田睦代、久場由真仁、大友麗、吉田弘. 地方衛生研究所

全国協議会九州ブロック内における遺伝子解析装置に関する技術管理研修について 第 32 回公衆衛生情報研究協議会.岡山市.平成 31 年 1 月 24-25 日

33) 大友麗、吉田弘 地方衛生研究所全国協議会 地方衛生研究所全国協議会中国四国ブロック内における信頼性確保に関する取組について 第 32 回公衆衛生情報研究協議会.岡山市.平成 31 年 1 月 24-25 日

34) 石田幸太郎、後藤史門、天沼美里、石村麻里奈、鈴木亮介、森田英嗣 日本脳炎ウイルスキャプシド蛋白質のアラニン置換変異体群の解析. 第 53 回日本脳炎ウイルス生態学研究会, 壬生町, 2018.6.1-2.

35) 荒川将志、田端桂介、石田幸太郎、新井亜利紗、小林万希子、有本大、鈴木亮介、森田英嗣 フラビウイルスは VCP 複合体を利用し宿主ストレス応答を制御する. 第 53 回日本脳炎ウイルス生態学研究会, 壬生町, 2018.6.1-2.

36) 鈴木亮介 HCV の Claudin-1 非依存的感染機構の解析. 山梨ウイルス感染症研究会, 山梨, 2018.8.3.

37) 鈴木亮介 経口感染する肝炎ウイルス, 知の市場、国立感染症研究所、東京、2018.11. 13.

38) 杉山隆一 A 型および E 型肝炎ウイルスの核酸検出法. 希少感染症診断技術研修会, 東京. 2019.2.

39) 松田麻未、松浦知和、鈴木亮介 種々のレポーターを有する一回感染性フラビウイルスの作製. 第 4 回デザイン生命工学会, 東京, 2019.3.8.

40) 鶴田爽、高橋萌、町田亮人、藤田創、伊藤隼人、宮本康太郎、三栖涼雅、井澤和也、出口英梨子、Nattanon Tharachai、西田暁史、安田翔也、中澤杜浩、林宣弘、鈴木亮介、山村雅幸、田川陽一 デングウイルスの血清型流

行予測モデルの構築および血清型検出系の確立。第 4 回デザイン生命工学会、東京、2019.3.8.

41) Aly HH, Watanabe N, Chayama K, Wakita T. IL-1b/ATF3 mediated regulation of HBx mRNA decay. The 66th Annual Meeting of the Japanese Society for Virology. Kyoto, 2018. Oct. 28-30.

42) Kato T, Yamada N, Murayama A, Murata K, Shiina M, Muramatsu M, Wakita T. Anti-Hepatitis B Virus Effects of IFN-λ3. The 66th Annual Meeting of the Japanese Society for Virology. Kyoto, 2018. Oct. 28-30.

43) Murayama A, Fujiwara K, Yamada N, Shiina M, Muramatsu M, Wakitata T, Kato T. Antiviral Tanaka Effects of Second-generation NS5A Inhibitor evaluated in Hepatitis C Virus Cell Culture System with Full-genome Infectious Clones. The 66th Annual Meeting of the Japanese Society for Virology. Kyoto, 2018. Oct. 28-30.

44) 加藤孝宣、疋田隼人、竹原徹郎 HCV キメラウイルス培養系を用いた新規 NS5A 阻害剤耐性変異の解析. 第 54 回日本肝臓学会総会. 大阪, 2018. 6. 14-15.

45) 椎名正明、加藤孝宣、井廻道夫 B 型肝炎ウイルス持続感染機序の免疫的探索. 第 54 回日本肝臓学会総会. 大阪, 2018. 6. 14-15.

46) 新田沙由梨、朝比奈靖浩、佐藤綾子、三好正人、角田知之、永田絃子、金子俊、北畑富貴子、村川美也子、中川美奈、東正新、柿沼晴、加藤孝宣、渡辺守 HCV NS5A キメラ株感染培養系を用いた NS5A 阻害剤に対する耐性変異と薬剤感受性評価システムの構築. 大阪, 2018. 6. 14-15.

47) 村山麻子、山田典栄、藤原圭、村松正道、脇田隆宇、

加藤孝宣 HCV 細胞培養系を用いた第二世代 NS5A 阻害剤の抗ウイルス活性と薬剤耐性変異の解析. 第 54 回日本肝臓学会総会. 大阪, 2018. 6. 14-15.

48) 山田典栄、加藤孝宣、奥瀬千晃 首都圏における B 型急性肝炎の変遷とウイルス学的検討. 第 54 回日本肝臓学会総会. 大阪, 2018. 6. 14-15.

49) 山田典栄、村田一素、加藤孝宣 核酸アナログ投与で誘導される IFN  $\lambda$  3 による抗 HBV 効果の検討. 第 54 回日本肝臓学会総会. 大阪, 2018. 6. 14-15.

50) Muramatsu M, Kitamura K. 第 54 回日本肝臓学会 平成 30 年 6 月 14 日 ワークショップ口頭発表 FEN1 is involved in HBV cccDNA formation.

51) Muramatsu M. 平成 30 年度 北陸腸内細菌研究会 金沢大学医学部記念館、平成 30 年 7 月 14 日 (土)

52) Muramatsu M. B 型肝炎ウイルス複製機構の解析 口頭発表

53) Muramatsu M H30 年 9 月 15 日 (土) 第 70 回北日本小児科学会 秋田県総合保健センター 大会議室

54) Muramatsu M 『ロタ、ポリオ、B 型肝炎ウイルスワクチンの現状とトピックス』特別講演 (座長: 細谷光亮先生) 招待講演

55) Muramatsu M 2018 年度日本消化器関連学会週間 (JDDW 2018) 「サテライトシンポジウム 86」11 月 2 日 (金) 神戸ポートピアホテル 南館 1 階 大輪田 C 「第 7 会場」B 型肝炎の治療の残された課題と今後の展望: 基礎研究から座長: 横須賀 収 先生 招待講演

56) Saso W, Tsukuda S, Ohashi H, Fukano K, Morishita R, Matsunaga S, Ohki M, Ryo A, Park SY, Suzuki R, Aizaki H, Muramatsu M, Sureau C, Wakita T, Matano T, Watashi

K. AlphaScreen technology targeting the viral envelope-receptor interaction identified a novel HBV entry inhibitor, rapamycin. The 66th Annual Meeting of the Japanese Society for Virology. Kyoto Terra. (2018.10.28-30) 口頭発表

57) Saso W, Iwamoto M, Muramatsu M, Matano T, Watashi K. B 型肝炎ウイルス細胞進入機構の解析. 第 15 回ウイルス学キャンプ in 湯河原. ニューウェルシティ湯河原. (2018/6/6-7) ポスター発表

58) 岩本将士、岩見真吾、渡士幸一 D 型肝炎ウイルス生存戦略の理解と意義について. 第 14 回ウイルス学キャンプ. P19. 湯河原. 6 月. 2018

59) Iwamoto M, Saso W, Sugiyama R, Ishii K, Suzuki R, Aizaki H, Ryo A, Ohtani N, Muramatsu M, Iwami S, Y, Wakita T, Watashi K; Identification of host kinases that regulate hepatitis B virus internalization. 第 66 回日本ウイルス学会学術集会. 京都. 10 月. P2-VE-13. K, 2018

60) 深野顕人、Passioura Toby、志村聡美、佐宗若奈、森下了、小笠原裕樹、田中靖人、溝上雅史、Sureau Camille、菅裕明、脇田隆字、渡士幸一 B 型肝炎ウイルス侵入阻害ペプチドの同定とその機序の解析. 第 15 回ウイルス学キャンプ in 湯河原、P16、湯河原、(2018/6/6-7) ポスター発表

61) Fukano K, Tsukuda S, Ohki M, Park SY, Suzuki R, Aizaki H, Muramatsu M, Wakita T, Ogasawara Y, Watashi K. Oligomerization of NTCP is required for hepatitis B virus internalization. 第 66 回日本ウイルス学会学術集会、W1-3-01、京都、(2018/10/28-30) 口頭発表

62) 深野顕人、Toby Passioura、志村聡美、佐宗若奈、森下了、小笠原裕樹、田中靖人、溝上雅史、Camille Sureau、脇田隆字、菅裕明、渡士幸一 NTCP/SLC10A1

の胆汁酸取り込み機能に影響しない選択的 B 型肝炎ウイルス侵入阻害ペプチドの同定. 日本薬学会第 139 年会、21N-pm17S、千葉、(2019/3/20-23) 口頭発表

63) Ohashi H, Nakajima S, Kim S, Suzuki R, Aizaki H, Fukasawa M, Kamisuki S, Sugawara F, Ohtani N, Muramatsu M, Wakita T, Watashi K. Hepatitis C virus infection triggers the transactivation of aryl hydrocarbon receptor to rearrange hepatic lipid biosynthesis. The 66<sup>th</sup> Annual Meeting of the Japanese Society for Virology. Kyoto Terrsa (2018.10.28-30) 口頭発表

64) 渡邊則幸、鈴木貴也、伊達朋子、スス・ムエー、Hussein H Aly、相崎英樹、村松正道、脇田隆字 感染性を有する 4 型 C 型肝炎ウイルスの樹立. 第 28 回抗ウイルス療法学会学術集会・総会. 札幌. 6 月. 2018 口頭発表

65) 渡邊則幸、鈴木貴也、伊達朋子、スス・ムエー、Hussein H Aly、杉山真也、溝上雅史、相崎英樹、村松正道、脇田隆字 感染性を有する 4 型 C 型肝炎ウイルスの樹立. 第 66 回日本ウイルス学会学術集会. 京都. 10 月. 2018 ポスター発表

66) 佐藤李香、渡邊則幸、小柳円、有村裕、脇田隆字 ルシフェラーゼ遺伝子を有するキメラウイルスの性状解析. 第 15 回ウイルス学キャンプ in 湯河原、湯河原、(2018/6/6-7) ポスター発表

67) 佐藤李香、渡邊則幸、Hussein H Aly、小柳円、有村裕、相崎英樹、村松正道、脇田隆字 高ウイルス産生能を有するレポーターキメラ C 型肝炎ウイルスの構築. 第 66 回日本ウイルス学会学術集会. 京都. 10 月. 2018 ポスター発表

68) 若江亨祥、近藤悟、Hai Pham、村松正道、吉崎智一 EBV LMP1 alters APOBEC3 expression profile, and

hypermutates mitochondrial DNA. 第 66 回日本ウイルス学会学術集会、W1-6-20、京都、(2018/10/28-30) 口頭発表

69) Suzuki R. Genetic modification of flaviviruses for diagnosis and vaccine. The 17th Awaji International Forum on Infection and Immunity. Awaji 2018.9.4-7. (招待講演)

70) 清原知子、小川知子、長島真美、新開敬行、佐藤弘、多屋馨子、鈴木亮介、村松正道、大石和徳 B型肝炎ワクチン定期接種化と小児HBs抗体陽性率の変化. 第 22 回日本ワクチン学会, 2018. 12. 8-9. 神戸.

71) 福島慎二、清原知子、石井孝司、中野貴史、濱田篤夫 A型肝炎ワクチン接種後のサロゲートマーカーに関する研究. 第 22 回日本ワクチン学会, 神戸, 2018. 12. 8-9.

72) 米満研三、Virhuez Milagros、李天成、黒田 雄大、立本完吾、Supriyono Supriyono、南 昌平、歟田龍星、高野愛、下田宙、Phichitraslip Thanmaporn、Rerkamnuaychoke Worawut、鈴木和男、前田健 野生動物、伴侶動物、産業動物における E 型肝炎ウイルス感染状況調査. 第 161 回日本獣医学会, 筑波, 2018.9.

73) Yato K, Onodera T, Matsuda M, Fujimoto A, Watashi Aizaki H, Kato T, Moriishi K, Tamura K, Takahashi Y, Wakita T, Muramatsu M, Suzuki R. Generation of monoclonal antibodies against hepatitis B virus preS1 region from antigen-specific memory B cells. 日本ウイルス学会第 66 回学術集会, 京都, 2018. 10. 28-30.

74) 張文静、吉崎佐矢香、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. Characterization of rabbit HEV infection in Japanese white rabbits. 日本ウイルス学会第 66 回学術集会, 京都, 2018. 10. 28-30.

75) 齊藤恭子、深澤征義、白砂圭崇、鈴木亮介、脇田隆  
宇、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  
ルス産生の比較解析. 日本薬学会, 幕張, 2019. 3.  
20-23.

### III. その他

#### 1. 村山庁舎一般公開

##### 1) サイエンスカフェ

「サポウイルスって知ってる?」(平成 30 年 7 月 28 日)

[岡智一郎]

#### 2. 著書

1) 村上耕介、藤本陽、片山和彦 実験医学別冊「決定版  
オルガノイド実験スタンダード」、4 章 関連技術/4 小腸オ  
ルガノイドを用いたヒトノロウイルス培養系、平成 31 年 3 月  
26 日、羊土社

#### 3. 新聞取材

1) 朝日新聞サイエンスコラム「ののちゃんのDO科学」  
「なぜワクチンがない感染症があるの？」をテーマにしたコ  
ラム作成にあたり、取材依頼を受け、協力した。平成 31 年  
2 月 23 日刊の朝刊に掲載された。

[染谷雄一]