

2. ウイルス第二部

部長 村松 正道

概要

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

一方、2020年は感染症の歴史という意味では特異な年となった。1月頃より中国武漢で新型コロナウイルス感染症(COVID19)のアウトブレイクが発生し、瞬く間にパンデミックとなった。本邦においては2月初旬で武漢都市封鎖に伴う帰国者チャーター機5機分全員PCR検査や横浜港クルーズ船(乗員3400人)のPCR検査などをはじめとして、全所体制で新型コロナの検査、ワクチン、治療法、診断、疫学に当たる必要が生じた。このうちウイルス第二部は、戸山の三、四室は、戸山PCR検査チームの一角を分担し、一・二・五室は村山PCR検査チームを支えた。また四室、渡主任研究官のチームは、治療法開発のうち抗ウイルス剤のスクリーニングを担当し成果をあげた。二室、吉田、喜多村主任研究官は、ポリオウイルス環境サーベイランスの技術をコロナウイルスに適用すべく研究班を立ち上げた。

以下、令和2年(2020年)度の活動を紹介する。

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

第一室はまた、不活化ポリオワクチン、ロタウイルスワクチンの国家検定業務を担当している。不活化ポリオワクチンのうち、弱毒型セービン株由来不活化ポリオワクチンを含む4種混合ワクチン(DPT-sIPV:沈降精製百日せき破傷風不活化ポリオ(セービン株)混合ワクチン)は、不活化ポリオワクチン成分の力価試験(ラット免疫原性試験)を実施するとともに、

これらの4種混合ワクチンに用いる中間段階試験品(不活化ポリオ3価混合原液)の国家検定試験として不活化試験を実施する。強毒株に由来するソークワクチンは、単独不活化ポリオワクチン製剤の他、これを含む沈降精製百日せき破傷風不活化ポリオ混合ワクチン(DPT-cIPV)があり、いずれも国家検定試験としてD抗原含量試験を実施する。一方、ロタウイルスワクチンは、単価の経口弱毒生ロタウイルスワクチンと5価経口弱毒生ロタウイルスワクチンの2種類の製剤の国家検定試験を実施している。令和2年10月からロタウイルスワクチンの定期接種が開始されたことに伴い、令和2年4月からロタウイルス感染症流行予測調査事業が開始された。本事業では、感染源調査として、重症患者便検体中のロタウイルス株の同定を行う。

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

第二室はWHO世界ポリオ根絶計画に参画している。WHOの指定をうけて、世界の特殊専門ラボとして、また西太平洋地域の指定ラボとして世界各地で分離されるポリオウイルスの性状解析を続けた。西太平洋地域では2000年以来ポリオフリーを維持してきた。西太平洋地域以外でも野生株ポリオ流行国は残り2ヶ国となり、いよいよ世界的ポリオ根絶達成およびその後のOPV接種停止が視野に入ってきている。一方、WHO西太平洋地域でも、ワクチン接種率の低いハイリスク地域(ラオス、パプアニューギニア、フィリピン、マレーシア等)では、ワクチン由来ポリオウイルスの流行が近年発生しており、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(GAPIII)を公開した。我が国でも本指針に対応し、ポリオウイルス・バイオリスク管理体制の整備を進めている。WHO GAPIIIに基づくポリオウイルス取扱い施設(PEF)認証の第一段階である認証参加申請を2019年12月に、厚生労働省に提出した。国内エンテロレファレンスセンターとしてのレファレンス活動を継続し、2018年5月から感染症法による全数報告対象疾患となった急性弛緩性麻痺症例の検査体制整備に向けた取り組みを進めた。

第三室および第四室ではB型およびC型肝炎ウイルスの行政研究および基礎研究をおこなった。行政研究としては、

ウイルス第二部

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。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、2月には国内の肝炎ウイルス研究者による肝炎ウイルス研修会を開催し、若手研究者の育成に努めた。B型肝炎ウイルスの研究では、培養細胞を用いた新たな感染評価系の構築を行った。さらに、ウイルス複製増殖に関わる宿主因子とその機序を明らかにした。C型肝炎ウイルス研究も様々な研究課題が展開されているが、Direct Active Antiviral (DAA)による画期的な抗ウイルス療法の登場により、今後の研究の方向性を検討する時期にある。より効果的で安価な治療法の開発、感染予防法の開発が求められる。

第五室はA型およびB型肝炎ワクチンの検定、検査を担当している。本年度はA型肝炎ワクチン2件、B型肝炎ワクチン23件の国家検定をおこなった。肝炎ワクチン国家検定は動物を用いた力価試験を実施しているが、試験管内力価試験追加の準備に必要なデータの収集等の対応を行なっている。A型肝炎ウイルスの研究では、ウイルス複製機構の解明のための分子ウイルス学的研究を行なっている。また国内のA型肝炎の流行状況について継続的な積極的疫学調査による分子疫学的解析を担当している。E型肝炎ウイルスの研究では、様々な遺伝子型の分子クローンを樹立し、動物モデルを確立するとともに、低分子化合物や siRNA ライブラリーのスクリーニング、積極的疫学調査による流行状況の分子疫学的解析を行った。

人事面では、第二室に清水博之室長、第一室の下池貴志博士が定年退職となり、清水氏は引き続き再任用職員としてウイルス二部で勤務することとなった。また、第四室の渡士幸一博士が、治療薬開発センターの治療薬開発総括研究官に栄転された。3氏の長きに亘る多大な部への貢献に感謝する。

以下のような国際的技術協力をおこなった。

国際協力に関する業務

第一室

韓国食品医薬品安全庁、国立医薬品食品評価研究所、セービン株由来不活化ポリオワクチンの韓国国内標準品制定にかかわる共同研究、令和2年7月～8月

[染谷雄一]

研修に関する業務

行政検査

第二室

急性弛緩性麻痺疑い症例のポリオウイルス分離検査

1例 2検体

第三室:

体外診断薬承認前試験;

Alinity m システム HBV (アボットジャパン)

Alinity m システム HCV (アボットジャパン)

ミュータスワコー HBV-DNA 定量 (富士フィルム和光純薬株式会社)

第五室:

E型肝炎 2件 4検体

サーベイランス業務

I. ロタウイルス感染症流行予測調査事業

(1) ロタウイルスの感染源調査

ア) 各地衛研による調査状況

2020年10月からのロタウイルスワクチン定期接種化に伴い、2020年4月からロタウイルスの感染源調査を開始した。初年度にあたる2020年度は、大阪府、兵庫県、新潟県の3か所で調査を行った。しかし、2020年は新型コロナウイルスの流行に伴う緊急事態宣言が発令されたこと等が要因となり、ロタウイルスの患者数が例年より著しく少なく、リアルタイム PCR によるスクリーニングでは、大阪府で1例検出されたのみにとどまった。

[藤井克樹、染谷雄一]

イ) 検出されたロタウイルスの遺伝子解析

大阪府で検出されたロタウイルスの検体について、感染研において次世代シーケンサーによる遺伝子解析をおこなった。その結果、このウイルスの遺伝子型構成は G9-P[8]-I1-R1-C1-M1-A1-N1-T1-E1-H1 であり、典型的な Wa 型 G9 (lineage 6) であった。これはコロナ禍前から全国的に継続して流行していたタイプであり、コロナ禍においても継続して分布しているものと考えられた。

[藤井克樹、染谷雄一]

II. A型およびE型肝炎の流行調査

第五室:

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

A型肝炎 32検体

E型肝炎 38検体

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

業績

調査・研究

I. 下痢症ウイルスに関する研究

1. ノロウイルスに関する研究

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

構築した RdRp の in vitro RNA 転写活性測定系を用いて、ノロウイルスのマイナス鎖ゲノム RNA からプラス鎖ゲノム RNA の合成にどの領域が重要かを鋳型 RNA に様々な変異を入れることにより調べた。その結果、マイナス鎖ゲノム RNA の 3'末端 31nt が RdRp による RNA 合成に必要な十分であることを明らかにした。更にこの領域が RdRp との相互作用に必要なことをゲルシフトアッセイで明らかにした。

[下池貴志、岡智一郎、林豪士、村松正道]

(2) ヒト型抗ノロウイルスフェージ抗体の性状解析

ノロウイルス VLP を抗原に用い、ヒト由来フェージ抗体ライブラリーをスクリーニングし、遺伝子型特異的、遺伝子群内交叉反応性、遺伝子群間交叉反応性のヒト型抗ノロウイルス抗体を単離した。各抗体の性状解析を、ELISA、Surface Plasmon Resonance によって進めている。

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

(3) ノロウイルスの急激な感染拡大のメカニズムの解明

ノロウイルス流行株の疫学解析と血液型抗原への結合能の in vitro における解析を両立させた研究を進めている。疫学的に劣勢な遺伝子型であっても、血液型抗原結合能の変異により流行株になりうるという証拠の提示は、ノロウイルスに対する公衆衛生戦略を策定する上で大きな意義がある。

[白土東子、佐野大輔(東北大学)、中込とよ子(長崎大学)、

中込治(長崎大学)]

(4) ヒトノロウイルス感染細胞の経時的なトランスクリプトーム解析

ヒトノロウイルス感染に伴い変動する免疫応答関連遺伝子群の特定を目的として、前年度(感染 24 時間後)とは異なるタイムポイント(感染 12、48 時間後)におけるウイルス感染・非感染腸管オルガノイドの遺伝子発現変動を RNAseq 法により解析した。その結果、ウイルス認識に関わる RIG-I 様受容体、および下流のシグナル伝達経路 (JAK-STAT 経路など) に関わる遺伝子群の発現が、感染後一貫して上昇していることを明らかとした。

[林豪士、村上耕介、山岡曜子、村松正道]

(5) siRNA を用いたヒトノロウイルス感染制御因子の探索

RNAseq 解析にて、感染に伴い発現上昇が認められた遺伝子群について、ヒトノロウイルス感染に抑制的に働いているかを検証するため、siRNA のリバーストランスフェクション法による遺伝子ノックダウン腸管オルガノイドの作製を試みた。その結果、65%程度ノックダウンすることに成功したものの、ウイルスの増殖効率の上昇、あるいはインターフェロン応答の低下といった知見は現時点では得られなかった。今後、siRNA 導入法の最適化を図ると共に、遺伝子ノックアウト腸管オルガノイドの樹立も並行して試みる。

[林豪士、村上耕介、山岡曜子、村松正道]

(6) 化合物スクリーニングによる新規抗ヒトノロウイルス阻害薬の探索

市販の抗ウイルス薬ライブラリーを用いて、ヒトノロウイルス感染を阻害する化合物を探索した。その結果、C型肝炎ウイルスの治療薬として開発されたダサブビルが、GIL3型及びGIL4型ヒトノロウイルスの腸管オルガノイド内での増殖を抑制することを見出した。また、ダサブビルはヒトロタウイルス及びSARS-CoV-2の感染も阻害することを明らかとした。

[林豪士、村上耕介、平野順紀、藤井克樹、山岡曜子、大橋啓史、渡士幸一(治療薬・ワクチン開発センター)、Estes MK(ペイラー医科大学)、村松正道]

(7) ヒトノロウイルス培養系に供する腸管オルガノイドの培養条件の最適化

腸管オルガノイドを用いたヒトノロウイルス培養系の最適化を引き続き実施した。オルガノイドの維持に必要な成長因子 Wnt-3a, R-spondin, Noggin の3種類のリコンビナントを一度に発現させる細胞が ATCC より供給開始されたことから、ノロウイルス培養系への適用を検討した。その結果、従来法と比較してコストと手間が削減され、かつ従来通りのノロウイルス

増殖能を示された。

[平石依里、山岡曜子、村上耕介]

(8) 感染中和能を有するヒト型モノクローナル抗体の探索

ヒトから検出される主要なノロウイルス GI および GII の両方を認識するヒト型モノクローナル抗体が感染中和能を有するかどうかを GII.3 ヒトノロウイルスを用いて検証した。その結果いくつかの抗体がウイルス増殖を抑制することが示された。今後は GII.3 以外の遺伝子型の感染中和能を解析する。

[村上耕介、山岡曜子、平石依里、橋香奈、高橋宜聖 (免疫部)]

(9) ノロウイルスの非構造タンパク質 VPg の機能解析

ノロウイルスの非構造タンパク質 VPg はゲノム RNA と共有結合しており、宿主細胞の翻訳開始因子と相互作用することでウイルスタンパク質翻訳の開始に関与すると考えられているが、機能には不明な点が多い。我々は VPg に核移行シグナルと推定される複数の配列が存在することを見出したことから、その機能を免疫蛍光顕微鏡観察により検証した。その結果、N 末に存在する核移行シグナルが機能する可能性を示唆した。

[平石依里、山岡曜子、村上耕介]

(10) GIV ノロウイルスのリアルタイム PCR による検出感度改善の検討

ノロウイルス検出マニュアルに記載されているリアルタイム PCR 法では、検出されるノロウイルスの多数を占める GII に加え、稀ではあるが検出例が報告される GIV も検出可能なプライマー・プローブセットを使用している。しかし GII の検出感度の低下が指摘されていたことから、既存プライマー・プローブを用いた検出感度の改善を検討した。その結果、GII および GIV に特異的なプローブを混合することにより改善されることが示唆された。

[山岡曜子、村上耕介]

(11) ノロウイルス VLP の X 線結晶構造解析

昆虫細胞より調製したノロウイルスチバ株 (GI.4) の VLP 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)]

(12) ノロウイルス VLP の電子顕微鏡単粒子解析

昆虫細胞より調製したノロウイルス GI 株の VLP の電子顕微鏡単粒子解析を行い、詳細な三次元立体構造を決定した。

[染谷雄一、染谷友美 (理化学研究所)]

(13) ノロウイルス VLP と抗体複合体の電子顕微鏡単粒子解析

ノロウイルス GI 株 VLP と特異抗体との複合体の電子顕微鏡単粒子解析を実施し、三次元立体構造情報を得た。抗体の中和能について検討を進めている。

[染谷雄一、染谷友美 (理化学研究所)]

2. サポウイルスに関する研究

(1) サポウイルス核酸検出系の有用性検証

ヒトサポウイルスの遺伝子型は GI.1-7, GII.1-8, GIV.1, GV.1-2 に分類される。合成核酸で、これら全遺伝子型に反応性を検証できたリアルタイム RT-PCR および RT-PCR 系を用いて、実際に感染性胃腸炎患者臨床検体 (糞便)、環境水 (流入下水) から多様なサポウイルス遺伝子型を検出できることを示した。

[岡智一郎、高木弘隆 (安全実験管理部)、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)、佐藤重紀 (千葉県衛生研究所)、柴田伸一郎 (名古屋市衛生研究所)、三田哲朗 (島根県保健環境科学研究所)、八尋俊輔 (熊本県保健環境科学研究所)、高橋知子 (岩手県環境保健研究センター)、坂上亜紀恵、植木洋 (宮城県保健環境センター)、小林孝行 (福岡県保健環境研究所)、吳芳姿 (台湾 CDC)]

(2) ヒトサポウイルスのシリアルパスセージと培養スケールアップの達成

ヒト十二指腸由来細胞株 (HuTu80) を用いるサポウイルス培養条件の至適化により、GI.1、GI.2、GII.3 株についてウイルス継代および培養スケールアップを達成した。ウイルスストックの調製により、ウイルス陽性糞便に依存しない研究が可能になった。

[岡智一郎、高木弘隆 (安全実験管理部)、下池貴志、片岡紀代 (感染病理)、斎藤博之 (秋田県保健環境センター)、辰巳智香、三田哲朗 (島根県保健環境科学研究所)、小林孝行 (福岡県保健環境研究所)]

(3) ヒト十二指腸細胞株を用いたサポウイルス感受性規定因子の解析

サポウイルスとパレコウイルスは同じヒト十二指腸由来細胞株で増殖する。我々が独自に見出したパレコウイルスの受容体候補因子を CRISPR/Cas9 系でノックアウトしたところ、パレコウイルスの増殖はまったく認められなくなったが、サポウイルスの増殖には影響しなかった。この結果からサポウイルスとパレコウイルスの感染は別の細胞性因子が関与することが示された。

[岡智一郎、高木弘隆 (安全実験管理部)]

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) 2019-20 年シーズンの北海道ロタウイルス検体の収集

札幌医科大学との共同研究で、北海道における A 群ロタウイルス(RVA) 流行株を調査するため、2019-20 年に北海道各地の医療機関で採取された RVA 胃腸炎症例の便検体を収集した。NTT 東日本病院(札幌市)、北海道医療センター(札幌市)、岩見沢市立総合病院(岩見沢市)、なかた小児科(札幌市)、とまこまいこどもクリニック(苫小牧市)、の 5 か所から、それぞれ 7、2、1、1、3 検体(合計 14 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)]

イ) 2019-20 年シーズンの北海道ロタウイルス検体の NGS 解析

2019-20 年の 14 検体について次世代シーケンサーにて全ゲノム解析を行い 12 検体の解析に成功した。RVA の遺伝子型分布は G1P[8] (Rotarix 株)が 1 検体、G2P[4]が 4 検体、ウマ様 G3P[8]が 2 検体、G8P[8]が 1 検体、G9P[8]が 4 検体であった。2020 年は新型コロナ禍の影響で RVA の検体が極端に少なく、岩見沢市立総合病院で採取された 1 検体(rotarix 株)と、なかた小児科で採取された 3 検体(全て G2P[4])のみであった。

[藤井克樹、津川毅(札幌医科大学)]

(2) 秋田県におけるロタウイルス分子疫学研究

秋田大学との共同研究で、秋田県における RVA 流行株を調査するため、2020 年シーズンに秋田県由利本荘市の由利組合総合病院で採取された急性胃腸炎による入院症例の便検体を収集した。当該病院の小児科では、2020 年シーズンの RVA 流行シーズンに 36 例の急性胃腸炎による入院症例があった。リアルタイム PCR 法によりスクリーニング検査を行ったところ、RVA 陽性となった検体は 1 例も無かった。

[藤井克樹、野口篤子(秋田大学)]

(3) 千葉県におけるロタウイルス分子疫学研究

東京女子医大八千代医療センターとの共同研究で、千葉県における RVA 流行株を調査するため、2020 年シーズンに同病院において採取された急性胃腸炎による入院症例の便検体を収集した。当該病院の小児科では、2020 年シーズンの RVA 流行シーズンに 36 例の急性胃腸炎による入院症例があった。リアルタイム PCR 法によりスクリーニング検査を行ったところ、RVA 陽性となった検体は 1 例も無かった。

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

(4) ロタウイルスワクチンの有効性に関する調査

北海道、秋田県、千葉県におけるロタウイルスの疫学調査データを用いて、RVA 陽性者、陰性者それぞれの RVA ワクチン接種率を求め、ワクチン有効性(VE)を算出した。その結果、入院症例を対象とした秋田県および千葉県の VE はそれぞれ 84.5%(症例数 57)および 81.0%(同 31)であった。一方、クリニックで外来症例を対象とした北海道の VE は、34%~89%と年によって大きく変動する結果が得られた。VE と流行株との関連性が疑われるものの、流行株の種類が多様かつ変動が激しいため、明確な関連性を示すのは困難であった。また、ワクチン接種により嘔吐の有症頻度が減少する等、軽症化する傾向が見られた。

[藤井克樹]

(5) リアルタイム PCR によるロタウイルス検出方法の検討

これまでの検討から、RVA を検出・定量するためのリアルタイム PCR 用プライマー・プローブセットとしては、Freeman らのグループが報告したもの(J Med Virol. 2008, 80(8):1489-96)が幅広いウイルス株を検出できるため良いと判断された。しかし、多数の便検体を用いた検証から、このプライマー・プローブセットは RVA 陰性であっても、しばしば非特異反応によるシグナルが得られることが判明した。原因を調査した結果、ヒトゲノム、腸内細菌、アストロウイルス等、様々な原因により非特異反応が起こり得ることが明らかとなったため、今後改良の余地があると考えられた。

[藤井克樹]

4. その他の下痢症ウイルスに関する研究

(1) パレコウイルスに対する特異抗血清の作製

ヒト十二指腸由来細胞株 HuTu80 で増殖させた 3 型パレコウイルスの大量調製、ウイルス精製を行い、ウサギ、モルモットでの抗血清作成を行った。効率的な増殖が達成できるウイルスについては、今後、同様の手法で特異抗血清の調製ができると考えられる。

[岡智一郎、高木弘隆、網康至、須崎百合子(安全実験管理部)、斎藤博之(秋田県保健環境センター)]

II. エンテロウイルスに関する研究

1. 実験室診断およびレファレンス活動

(1) 国内エンテロウイルスレファレンスセンターとしての活動
エンテロウイルスレファレンスセンター会議は延期となった。細胞は 1 箇所へ分与した。今年度は抗血清の分与要請はなかった。

[吉田弘(感染研)]

(2) 地方衛生研究所等における病原体検査の質保証に向けた人材養成に関する研究

地方衛生研究所等における病原体検査の質保証体制を検討すべく、検査部門による検査の質の自主管理の取り組みとして1年間のヒヤリハット事例の収集を行った。取り組みは継続して実施することが望まれる。また、地方衛生研究所における人材育成の課題を整理し、OJT時の新任、現任の検査担当者を対象としたコンピテンシーリスト作成を試みた。本リストは施設の検査体制に対応させるとともに、適宜内容をアップデートすることが必要と考えられる。

[小笠原和彦(青森県環境保健センター)、筒井理華、(青森県健康福祉部保健衛生課)、高橋雅輝、藤森亜紀子、山下裕紀、高橋知子(岩手県環境保健研究センター)、横井一(千葉市環境保健研究所)、望月靖(岡山県環境保健センター)、松岡隆介、吉田弘]

(3) ポリオ環境水サーベイランスを基盤とした新型コロナウイルス調査体制確立の研究

下水網を活用したポリオ環境水サーベイランスを実施中である。新型コロナウイルスも感染後糞便中に排出されることが知られている。このため既存のシステムを活用して、新型コロナウイルスを検出し、ウイルスゲノム量から地域感染者数を推計する場合の技術的な課題と運用上の課題について研究を行った。技術面では、1)下水中のコロナウイルス量は少ないため、検出法の改良は今後も必要なこと、2)下水固有の特性を考慮した処理区内のウイルス量の推計モデルの開発が望まれ、感染者数と連動したデータを蓄積する必要性があること、運用面では、関係部局間の情報共有内容及び公表内容、検出時の行政対応の在り方、データの公表時のリスクコミュニケーション、民間検査の活用と行政検査機関の役割(精度管理等)について更に検討する必要があること、が明らかになった。

[原本英司(山梨大学)、北島正章(北海道大学)、田嶋淳(国土交通省国土技術政策総合研究所)、貞升健志、長島真美(東京都健康安全研究センター)、濱崎光宏(福岡県保健環境研究所)、小澤広規(横浜市衛生研究所)、坂恭平(青森県環境保健センター)、筒井理華(青森県健康福祉部)、高橋雅輝、藤森亜紀子(岩手県環境保健研究センター)、植木洋(宮城県保健環境センター)、渡部徹(山形大学)、北川和寛(福島県衛生研究所)、小川貴史、藤沼裕希(千葉県衛生研究所)、小川泰卓、宮下広大(埼玉県衛生研究所)、板持雅恵(富山県衛生研究所)、葛口剛(岐阜県保健環境研究所)、伊藤雅(愛知県衛生研究所)、濱島洋介(和歌山県環境衛生研究センター)、望月靖、木田浩司

(岡山県環境保健センター)、喜多村晃一、吉田弘]

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ている。2020年度は98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。非ポリオエンテロウイルス15株が分離されたが、ポリオウイルスは分離されなかった。

[吉田弘、有田峰太郎、西村順裕、喜多村晃一、牛村英里、清水博之]

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

フィリピンでは、AFPサーベイランスを補完するため、2017年より環境サーベイランスを開始し、フィリピン RITM でポリオウイルス分離・同定を実施している。RITMにおける型内鑑別試験の結果、非ワクチン株ポリオウイルス(VDPV)と同定された検体、および、すべての2型ポリオウイルス株について、感染研においてVP1塩基配列解析による確認検査を実施している。2020年度には、計293株のポリオウイルスのシーケンスを引き続き行った。これらのサーベイランスの結果を踏まえて、2021年6月3日に、フィリピンにおけるcVDPV1および2の伝播の終息が宣言された。

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

3. 世界ポリオ根絶計画に関わる研究

(1) フィリピンで流行している2型ワクチン由来ポリオウイルスのNGS解析

フィリピンで2019年9月より流行している2型ワクチン由来ポリオウイルス(cVDPV2)について、詳細かつ網羅的な分子疫学情報を得るために次世代シーケンス(NGS)を用いた全長ゲノム配列解析を行っている。2020年度は流行終息の兆しが見られるが、引き続き採取されるAFP症例由来検体及び環境検体からNGS解析を行った。解析結果からウイルス伝播状況の地域差、ゲノム組換えの有無、中和抗原部位の変異について検討を進めている。

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

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

cVDPV2流行と同時期のフィリピンにおいて、免疫不全患

者から2型ワクチン由来ポリオウイルス(iVDPV2)が同定された。昨年度にサンガー法によるVP1領域配列決定及びNGS解析により、このiVDPV2と流行中のcVDPV2とは分子系統学的には関連性が低いことが示唆されたが、その後も継続してiVDPV2が検出されたことから、引き続きこの症例の全長ゲノム配列解析を行っている。時系列による変異頻度、アミノ酸置換を伴う変異の割合、quasi-speciesの変化についてデータを蓄積し分子疫学的な検討を進めている。

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

(3) 疑似ウイルスを用いた抗ポリオウイルス中和抗体価測定系の開発

これまでにワクチン株(Sabin株)カプシドを持ったポリオウイルス疑似ウイルスを作製し、従来法と高い相関を示す新規抗ポリオウイルス中和抗体価の測定法を開発した。しかし、手動による測定では、年間の感受性調査で測定される検体数(およそ1,200検体)の測定を行うことは到底できないため、測定の自動化を試みた。384-wellプレート用の希釈調製装置および分注機、プレート上清除去用遠心機により、ヒト血清の希釈、プレートコピーの作成、上清除去の過程が自動化された。また、データの解析の自動化も行った。従来用いていた分注機と合わせて、プレートの移動等の過程を除いて、測定の自動化及びハイスループット化に成功した。

[有田峰太郎、板持雅恵(富山県衛生研究所 ウイルス部)]

(4) 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

新規2型ポリオウイルス生ワクチン(nOPV2)の2つの候補株(nOPV2-c1および-c2)の感染により誘導される腸管内の中和抗体を測定するための材料および方法論を提供した。血清中に誘導された中和抗体価と比べて、腸管内の中和抗体価は非常に低いことが明らかになった。

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

4. エンテロウイルスおよびその他腸管ウイルスに関する研究

(1) エンテロウイルス A71 の感染性 cDNA クローンの作製

エンテロウイルス A71 SK-EV006 株の感染性 cDNA クローンを作製した。T7 プロモーターとウイルス 5'非翻訳領域を含むセンスプライマーと、ウイルス 3'非翻訳領域を含むアンチセンスプライマーを用いて、SK-EV006 株のゲノム全長を RT-PCR で増幅した。このゲノム全長を大腸菌プラスミド pBR322Y の制限酵素サイトにクローニングした。このプラスミドを pBREV71-SK-EV006 と名付けた。プラスミドを精製し、T7 プロモーターによる *in vitro* transcription によりウイルスゲ

ノム RNA を合成した。ゲノム RNA を RD 細胞にトランスフェクションしたところ、感染性をもつウイルスを回収できた。

[西村順裕、清水博之]

(2) EGFP を発現するエンテロウイルス A71 感染性 cDNA クローンの作製

感染後に EGFP を発現するエンテロウイルス A71 SK-EV006 株を作製した。pBREV71-SK-EV006 プラスミドのもつウイルスゲノムのオープンリーディングフレーム開始コドン直後に、EGFP 遺伝子と 2A プロテアーゼ切断配列を挿入した。プラスミドを精製し、T7 プロモーターによる *in vitro* transcription によりウイルスゲノム RNA を合成した。ゲノム RNA を RD 細胞にトランスフェクションしたところ、感染後に EGFP を発現するウイルスを回収できた。

[西村順裕、清水博之]

(3) ヘパラン硫酸合成酵素に関する研究

ヘパラン硫酸はエンテロウイルス A71 の受容体のひとつである。ウイルス感染におけるヘパラン硫酸の役割を詳細に解析するために、ヘパラン硫酸合成にかかわる酵素の発現プラスミドを作製した。さらにこのプラスミドを用いてヘパラン硫酸合成酵素を安定発現する細胞株を樹立した。この細胞ではプロテオグリカンのヘパラン硫酸付加が亢進しており、エンテロウイルス A71 との相互作用の解析に有用と考えられた。

[西村順裕、清水博之]

(4) アボカドから分離された新規抗エンテロウイルス化合物の解析

食用果物であるアボカドの中に、活性の高い抗エンテロウイルス 68 化合物(新規構造の天然化合物、avoenin と命名)が大量に含まれていることを発見した。Avoenin は、エンテロウイルスの中でエンテロウイルス 68 に特異的な阻害活性を示し、その作用機序としてウイルス粒子を安定化させ、脱殻の過程を阻害することが示唆された。

[有田峰太郎、湊野裕之、河上仁美、川原信夫(国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所)]

(5) エンテロウイルス A71 ウイルスタンパク質の病原性に関する分子生物学的解析

エンテロウイルス A71 ウイルスタンパク質の性状解析を行い、小胞体ストレス応答のマーカー遺伝子の発現を顕著に上昇させるエンテロウイルス A71 非構造タンパク質を同定した。このウイルスタンパク質の発現時に、小胞体ストレス応答経路を介したアポトーシス誘導による細胞死が促進されたため、エンテロウイルス A71 の病原性との関連について分子生物学的な検討を行った。また、ウイルスタンパク質内の小胞

体ストレス応答を誘導する機能部位の探索を行った。

[平野順紀、西村順裕、岡本徹(大阪大学微生物病研究所)、林豪士、豊嶋孝恵、喜多村晃一、吉田弘、清水博之、有田峰太郎、村松正道]

(6) 小胞体関連分解機構に関与するエンテロウイルス A71 宿主因子の探索

細胞感染時に GFP を発現し、簡便にウイルス増殖を評価することが可能な遺伝子組換えエンテロウイルス A71(EV71-GFP)を使用し、siRNA ライブラリによるエンテロウイルス A71 宿主因子の同定を試みた。EV71-GFP を用いて、エンテロウイルス A71 の生活環に関与することが予想される小胞体関連分解機構の遺伝子群を評価し、候補遺伝子の評価を進めている。

[平野順紀、西村順裕、岡本徹(大阪大学微生物病研究所)、林豪士、豊嶋孝恵、喜多村晃一、吉田弘、清水博之、有田峰太郎、村松正道]

(7) 急性弛緩性麻痺サーベイランスと検査体制の整備

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

[多屋馨子、藤本嗣人(感染症疫学センター)、清水博之、村松正道]

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

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

現在、PEF 候補施設として感染性 2 型ポリオウイルスを取扱うことができるのは、ワクチン製造施設を除くと、国内では感染研村山庁舎のみである。これまで、感染症流行予測調査事業におけるポリオウイルス中和抗体価測定は地衛研で実施されてきたが、すべての地衛研で、2 型ポリオウイルスを廃棄したことから、2017 年度調査から、2 型ポリオウイルス中和抗体価測定試験は、感染研ウイルス第二部で実施してい

る。地衛研で、従来通り 1 型および 3 型ポリオウイルスに対する中和抗体価測定を実施し、感染研ウイルス第二部で 2 型中和抗体価測定を行った。ただし、2020 年度は、千葉県からの 228 血清検体については、1,2,3 型ポリオウイルス中和抗体価測定を感染研ウイルス第二部で実施した。2020 年度は、6 地衛研からの計 948 血清検体(上記の千葉県からの血清検体を含む)について、2 型ポリオウイルス中和抗体価測定を実施し、試験結果を各地衛研に報告送付した。

[有田峰太郎、西村順裕、喜多村晃一、染谷雄一、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) レポーター遺伝子を持つ HAV を用いた抗 HAV 低分子化合物の探索

HAV が肝細胞で感染増殖する為に重要な宿主因子を探索する為に、ウイルスゲノム中にルシフェラーゼ遺伝子が挿入された HAV を Huh7.5.1 細胞に感染させ、1280 種類の生理活性物質ライブラリーのスクリーニングを実施した。細胞毒性を示さずに HAV の増殖を用量依存的に抑制する化合物を複数得た。そのうちの半数の化合物は subgenomic replicon の複製を抑制した。最も強い抗ウイルス作用を示した化合物は、異なる遺伝子型の HAV においても増殖抑制効果が認められた引き続き化合物の分子標的および作用機序の解析を進めている。

[鈴木亮介、松田麻未、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) A 型肝炎の国内発生動向調査

国内における 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た。例年 A 型肝炎は年間 300~400 件程度の報告があるが 2020 年は 119 件の報告に留まった。報告された 119 件のうち、33 検体の遺伝子情報を集積し、解析を行った。その内訳は遺伝子型 IA: 93.9%、遺伝子型 IB: 0.03%、遺伝子型 IIIA: 0.03%であった。国内での流行は主に遺伝子型 IA で、得られた遺伝子配列から各症例の多くは広域的な散発例と考えられたが、一部で相同性の高いクラスターが認められた。また 2018 年から MSM の間で流行していた株については 2020 年 4 月以降、検出されておらず収束したと考えられる。

[清原知子、杉山隆一、鈴木亮介、村松正道]

2. B 型肝炎ウイルス(HBV)に関する研究

(1) HBV 陽性パネル候補検体の HBV 配列解析

HBV 陽性パネル候補検体 20 例の血清より HBV を分離し HBV 遺伝子型の同定と HBV 遺伝子配列の確認を行った。HBV 遺伝子型の同定はイムニス HBV ゲノタイプ EIA (特殊免疫研究所) を用い、さらに PCR 法で HBV 遺伝子増幅が可能であった検体は塩基配列を決定の上、遺伝子型の確認を行なった。HBV ゲノタイプ EIA では 20 症例中、遺伝子型 B 4 例、C 10 例、D 1 例、判定不能 5 例であった。20 例中、HBV 全長の配列が確認できた症例は 8 例であり、これらは全て HBV ゲノタイプ EIA と遺伝子型が一致した。HBV S 領域の一部の配列のみ確認できた症例は 6 例であり、そのうち EIA で判定不能であった 1 症例が遺伝子型 A であることが明らかとなった。

[山田典栄, 大崎由喜, 加藤孝宣]

(2) TAF 抵抗性 B 型慢性肝炎患者の臨床学的特徴の検討

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

[山田典栄, 安田清美 (清川病院), 加藤孝宣]

(3) TAF 抵抗性 B 型慢性肝炎患者における薬剤耐性変異の解析

核酸アナログであるテノホビル・アラフェナミド(TAF)の投与開始から 1 年経過後も HBV DNA が陰性化しない B 型慢性肝炎症例 3 例の薬剤耐性変異の解析を行った。治療開始前、開始後の患者血清より HBV を分離し、HBV の RT 領域を PCR で増幅ダイレクトシーケンス法にてアミノ酸配列を解析した。その結果、3 例とも RT 領域に既報の核酸アナログ耐性変異は検出されなかった。1 例において TAF 投与開始前より rtT118A の変異が検出され、投与開始後に投与開始前には検出されなかった rtL220I の変異が検出された。2 例において投与開始前には検出されなかった rtQ215H の変異が投与開始後に検出された。

[山田典栄, 安田清美 (清川病院), 加藤孝宣]

(4) TAF 抵抗性 B 型慢性肝炎患者に共通にみられた変異の解析

TAF 抵抗性 B 型慢性肝炎患者 3 例の HBV RT 領域のアミノ酸配列の解析において、2 例に共通にみられた rtQ215H 変異について検討を行った。rtQ215H を持つ 1.4 倍長のコンストラクトを作製し、この変異を持つコンストラクトと変異を持たないコンストラクトを HepG2 細胞に導入し、導入細胞をテノホビル(TDF)で処理した後、RTD-PCR 法で HBV 薬剤感受性と複製能を評価した。その結果、rtQ215H の変異を有する株はこの変異を持たない株と比較し IC50 値は約 3.5 倍高値であった。また複製能には差を認めなかった。

[山田典栄, 安田清美 (清川病院), 加藤孝宣]

(5) 長期 TAF 抵抗性 B 型慢性肝炎患者にみられた二重変異の解析

TAF 抵抗性 B 型慢性肝炎患者 3 例中 1 例は投与から約 3 年経過後も HBV DNA の陰性化が得られていない症例であった。この症例の HBV RT 領域のアミノ酸配列の解析において確認された rtT118A と rtL220I の二重変異について検討を行った。rtT118A および rtL220I を持つ 1.4 倍長のコンストラクトを作製し、これらの変異を持つコンストラクトとこれらの変異を持たないコンストラクトを HepG2 細胞に導入し、導入細胞を TDF で処理した後、RTD-PCR 法で HBV 薬剤感受性と複製能を評価した。その結果、rtT118A+rtL220I の変異を有する株はこれらの変異を持たない株と比較し IC50 値は約 3 倍高値であった。また複製能には差を認めなかった。

[山田典栄, 安田清美 (清川病院), 加藤孝宣]

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

HBV Core 領域 I97L 変異は HBe 抗原陰性化後の B 型慢性肝炎患者において 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培養細胞を用いた 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 細胞への導入により得られたウイルスの感染力価について検討した。その結果、I97L 変異を持つ HBV では感染力の低下が認められた。そこでウイルス粒子に内包されている HBV ゲノムについて解析を行ったところ、I97L 変異型では I97 野生型と比較し、single-stranded DNA (SS)が relaxed circular DNA (RC)よりも多く検出され、I97L 変異による感染力の低下は不完全二本鎖 DNA ゲノムの合成が低下していることによるものと考えられた。

[山田典栄, 本多隆(名古屋大学), 加藤孝宣]

(7) Core 領域 I97L 変異が HBV 感染後の cccDNA 合成に与える影響についての検討

次に培養細胞で作製した HBV Core 領域 I97 野生型と I97L 変異型のウイルスの感染後の cccDNA の合成能に与える影響について検討を行った。これらの HBV を HepG2-NTCP 細胞に感染させ 12 日後の cccDNA 量をリアルタイム PCR で測定した。その結果、I97L 変異型では I97 野生型と比較し有意に cccDNA 合成量が低下していた。

[山田典栄, 本多隆 (名古屋大学), 加藤孝宣]

(8) Core 領域 I97L 変異がリサイクル依存性の cccDNA 合成に与える影響についての検討

さらに HBV Core 領域 I97L 変異がリサイクル依存性の cccDNA の合成能に与える影響についても検討を行った。I97 野生型と I97L 変異型の HBV 複製コンストラクトを HepG2 細胞に導入後、7 日後の cccDNA をサザンブロット法で検出した。その結果、I97L 変異型は I97 野生型と比較しリサイクル依存性の cccDNA 合成においてもその効率が低下していることが明らかとなった。

[山田典栄, 本多隆 (名古屋大学), 加藤孝宣]

(9) I97L 変異を持つ Core 蛋白質と L-HBs 抗原の結合能に関する検討

HBc と L-HBs 蛋白質の相互作用に対する I97L 変異の影響について NanoLuc Binary Technology (NanoBiT) を使用して解析を行った。HBc と LgBiT の融合タンパク質を発現するプラスミドと、SmBiT と L-HBs の融合タンパク質を発現するプラスミドを作製し、HBc を発現するプラスミドについては I97L を持つものと持たないものを準備した。これらのプラスミドを培養細胞に導入し、相互作用で得られる NanoLuc シグナルを測定したところ、I97L 変異を持つ HBc-LgBiT 発現プラスミドでは、この変異を持たないプラスミドと比較して、L-HBs 蛋白質と強い相互作用を認めた。

[村山麻子, 山田典栄, 本多隆 (名古屋大学), 加藤孝宣]

(10) 各種 HBs タンパク質の感染性 HBV 粒子産生における必要性の検討

3 種類の HBs タンパク質(HBs-L, HBs-M, HBs-S)の開始コドンに変異を導入し、発現できないようにしたコンストラクトを作製し、ウイルス粒子産生と感染性における各種 HBs タンパク質の必要性について検討した。HBs-L を発現しない場合は培養上清中の HBs タンパク質の総量は減少したが、感染性は上昇した。HBs-M を発現しない場合には、培養上清中の HBs タンパク質の総量は減少したが、感染性には影響がなかった。HBs-S を発現しない場合には、培養上清中には HBs タンパク質が分泌されず、感染性も見られなかった。

[村山麻子, 加藤孝宣]

(11) HBs-L タンパク質の感染性 HBV 粒子産生における必要性の検討

HBs-L タンパク質には 12 番目にもメチオニンがあり、1 から 11 番目のアミノ酸を欠失させると感染効率の高い HBV 粒子が作製できる。このメチオニンに変異を入れると培養上清中の HBs タンパク質の総量が減少し、ウイルスの感染性も低下した。反対に、1 番目のメチオニンに変異を入れて HBs-L が発現しないようにすると、培養上清中の HBs タンパク質の総量が減少するものの、ウイルスの感染性が上昇した。以上の結果から、11 アミノ酸短い HBs-L の存在が示唆され、完全長の HBs-L よりも感染性に寄与していると考えられた。

[村山麻子, 加藤孝宣]

(12) HBs-L タンパク質のミリストイル化の HBV の感染性への影響

HBs-L タンパク質は N 末端がミリストイル化されることが知られている。また、HBs-L タンパク質には 12 番目にもメチオニンがあり、HBs-L の N 末端側の 11 アミノ酸を欠失させると感染性が上昇するが、この N 末端欠失型の HBs-L(HBs-Ld11)にもミリストイル化され得る配列が存在する。そこで、ミリストイル化に重要なアミノ酸に変異を導入し、感染性への影響を検討した。HBs-L に変異を導入すると感染性は低下した。N 末端側 11 アミノ酸欠失型の HBs-Ld11 に変異を導入しても感染性は低下した。以上の結果から、HBs-L のミリストイル化はウイルスの感染性に重要であり、HBs-Ld11 は完全長の HBs-L と同様にミリストイル化されると考えられた。

[村山麻子, 加藤孝宣]

(13) HBs の糖鎖の感染性 HBV 粒子産生における必要性の検討

HBV の HBs タンパク質は糖鎖が付加されることが知られていることから、糖鎖付加部位に変異を導入し、ウイルス産生および感染性への影響を検討した。HBV プラスミドを細胞に導入すると、変異がある場合には、培養上清中に分泌される HBs 抗原、HBV DNA 量ともに減少し、感染性も減少した。密度勾配遠心法により培養上清を分画すると、HBs の分布では Sphere や filament のピークが消失したが、ウイルス粒子が存在するべきフラクションには変化はなかった。しかし、HBV DNA と HBc 抗原は、ウイルス粒子が存在するべきフラクションに存在する量が減少していたことから、糖鎖付加できない HBs の場合は、感染性のウイルス粒子産生ができないことが示唆された。

[村山麻子, 加藤孝宣]

(14) HBV 粒子に含まれる HBs タンパク質の糖鎖の解析

ウイルス粒子に含まれる HBs タンパク質に付加される糖鎖の種類について解析した。培養細胞で産生させ、密度勾配遠心法により精製したウイルス粒子を、ターゲットの違う 2 種類の脱糖鎖酵素、エンドグリコシダーゼ H とペプチド N グリコシダーゼ F でそれぞれ処理し、糖鎖の切断を観察した。ウイルス粒子に含まれる HBs の糖鎖はエンドグリコシダーゼ H では分解されず、ペプチド N グリコシダーゼ F で分解されたことから、complex 型であることが示唆された。

[村山麻子, 加藤孝宣]

(15) 糖鎖のない HBV 粒子作製の試み

HBV 粒子の感染性における HBs タンパク質の糖鎖の影響を検討するために、N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ I (GnTI) 活性を持たない細胞で糖鎖のついていないウイルスを作製することを試みた。通常の HEK293 細胞、および 293GnTI(-)細胞に HBV プラスミドを導入したが、いずれの細胞でも培養上清中に感染性のウイルスは分泌されなかったことから、HEK293 系の細胞では感染性の HBV の産生はできないと考えられた。

[村山麻子, 渡邊則幸, 加藤孝宣]

(16) 定量可能タグ付加 HBs 蛋白質を用いた HBs 抗原検出用体外診断薬の評価

HiBiT タグを付加した HBs 蛋白質を培養細胞で発現させ、細胞培養液に含まれる HBs 蛋白質の HBs 抗原量を HBs 抗原検出用の体外診断薬キットで測定し、HiBiT タグの定量値と比較することにより、絶対評価を行った。各キットにおいて使用している抗体の種類や数により、値が大きく異なっており、また、特定の遺伝子型の測定値が低く見積られるキットも存在した。ワクチンエスケープ変異である G145R は多くのキットで低く見積られてしまうことが明らかとなった。

[村山麻子, 百瀬暖佳(血液安全性研究部), 浜口功(血液安全性研究部), 加藤孝宣]

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

No curative drug for HBV is available. 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. To focus on cccDNA formation and maintenance, we used HBV/NL reporter virus which reflects the early stages of HBV infection (from entry to cccDNA formation and transcription). To identify the host factors associated with these stages, we performed loss of function experiments using siRNA libraries. So far we

screened 2200 human genes, and the interesting hits are under investigation

[Hussein H Aly, Tawfeek Hussein, Takanobu Kato]

(18) Identifying the mechanism of MafF on the regulation of HBV replication.

In 2019 we identified MafF as a suppressor of transcription from HBV-core promoter, leading to the consequent suppression of HBV-replication. We also showed that CHIP analysis confirmed the direct interaction between MafF and HBV-core promoter. In 2020 we established CRISPR/CAS9 MafF KO cells (MafF-KO-11) which showed a higher infectivity and replication of HBV compared to original cells. We identified an overlapping binding site between MafF and HNF4A at HBV-enhancer 2 region. Higher expression of MafF led to competitive suppression of HNF4A binding to this site. This was confirmed by CHIP analysis. The induction of MafF expression by IL-1b led to higher interaction between MafF and HBV-core promoter and lower interaction between HBV-core promoter with HNF4A.

[Hussein H Aly, Marwa Khalil, Takanobu Kato]

(19) KIF4A is a new host factor regulating HBV/HDV entry.

In 2019 we found that KIF4a is a pro-HBV host factor that supports HBV infection by inducing NTCP translocation to the surface hepatocytes (HepG2-hNTCP) where it acts as a receptor for HBV virus and induce its internalization. In 2020, we found that knockdown of KIF4A expression blocked both wild type HBV, and HDV infection to HepG2-hNTCP and primary human hepatocytes (PXB). Immunofluorescence analysis (IF) showed the co-localization between KIF4A and NTCP (HBV entry receptor) over the microtubule filaments. Both cellular fractionation and IF showed that transient KIF4A depletion suppressed surface and increased the intracellular NTCP levels. This effect was counteracted by the overexpression of wild type but not ATPase-dead KIF4A. Co-immunoprecipitation of KIF4A showed that KIF4A physically binds to NTCP. Further analysis is undergoing to identify small molecules targeting KIF4A and suppress HBV/HDV infection.

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

(20) B型肝炎ウイルス内在化機構の解析

HBV 内在化阻害化合物として同定した troglitazone の作用機序を解析することにより、未だ全貌が明らかでない HBV 内在化メカニズムを解析した。Troglitazone は HBV の感染受容体である NTCP の多量体形成を阻害することが明らかにな

った。また、NTCP の多量体化に重要なアミノ酸を同定するとともに、それをアラニン置換した変異体は多量体を形成せず、HBV 内在化を抑制することを明らかにした。これらの結果より NTCP 多量体化が HBV 内在化を引き起こす 1 つの要因であることが示された。

[深野顕人、大嶋美月、朴三用 (横浜市立大学)、若江亨祥、渡士幸一、村松正道]

(21) 上皮成長因子受容体による B 型肝炎ウイルス内在化および輸送制御機構の解明

HBV は細胞膜上で感染受容体 NTCP と結合した後に上皮成長因子受容体 (EGFR) を介して細胞内へ侵入する。その後、HBV-NTCP-EGFR を含むエンドソームは初期エンドソーム・後期エンドソーム・リソソームへと局在が時間依存的に変化することを明らかにした。後期エンドソームへの輸送活性を失活させた EGFR は HBV 内在化を補助する一方で、HBV の後期エンドソームへの輸送およびウイルス感染を補助しなかった。また EGFR の後期エンドソームへの輸送を促進する宿主因子 STAM をノックダウンした細胞では後期エンドソームへの HBV 輸送および HBV 感染が低下し、制限する宿主因子 LAPTM4B をノックダウンした細胞では後期エンドソームへの HBV 輸送および HBV 感染が上昇した。これら結果は HBV が細胞内侵入した後に感染成立のために後期エンドソームへ少なくとも到達する必要がある、それは EGFR 輸送経路依存的であることを示唆する。

[岩本将士、佐宗若奈、西岡華実、大橋啓史、杉山隆一、梁明秀(横浜市立大学)、朴三用 (横浜市立大学)、村松正道、俣野哲朗 (エイズ研究センター)、岩見真吾(名古屋大学)、脇田隆宇、渡士幸一]

(22) 新規 D 型肝炎ウイルスの同定と性状解析

鳥類および齧歯類より D 型肝炎ウイルス (HDV) 様配列 (tgDeV、mmDeV) を同定した。これら配列を組み込んだ発現プラスミドを作成し、ヒト肝臓由来細胞株 Huh7 細胞およびウッドチャック肝臓由来細胞株 WCH-17 細胞での複製能を評価した。プラスミドをそれぞれ導入した細胞では tgDeV、mmDeV 由来の RNA およびタンパク質が細胞内で産生されたが、培養上清よりウイルス RNA は検出されなかった。また HDV とは異なり、HBV エンベロープ存在下においても、ウイルス RNA が培養上清より検出されなかった。これら結果は、新規に同定された tgDeV、mmDeV は HDV に近縁であるものの、その性質は大きく異なり、HBV をヘルパーウイルスとして利用しない可能性を示唆する。

[岩本将士、村松正道、岩見真吾(名古屋大学)、渡士幸一、堀江真行 (大阪府立大学)]

(23) HBV RT の伸長反応を阻害する化合物の同定

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

[中嶋章悟、脇田隆宇、豊田哲也 (福祉村病院長寿医学研究所)、渡士幸一]

(24) HBV RNase H リコンビナントタンパク質の結晶化発現し得られた HBV RNase H リコンビナントタンパク質を所属および共同研究室所有の 1252 種類の結晶化スクリーニング溶液キットより結晶化条件を探索した結果、複数の条件でタンパク質の微結晶が確認された。しかしながら構造解析可能な良質な結晶は得ることはできなかった。そのため発現精製の見直しを行い、引き続き結晶化を試みている。

[中嶋章悟、渡士幸一、朴三用 (横浜市立大学)、豊田哲也 (福祉村病院長寿医学研究所)]

(25) HBV 感染阻害コレステロール誘導体の同定

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

[大嶋美月、深野顕人、岩本将士、倉持幸司(東京理科大学)、渡士幸一]

(26) 上皮増殖因子受容体を標的とした HBV 感染阻害戦略

HBV 感染を制御する上皮増殖因子受容体(EGFR) を標的とし、EGFR と感染受容体 NTCP との相互作用を阻害するペプチド (デコイペプチド)を用いて HBV 感染阻害を試みた。デコイペプチドは、EGFR の代表的な生理機能に影響を与えず、EGFR と NTCP の結合を阻害することにより、HBV の細胞内侵入を阻害した。このペプチドは、核酸アナログ耐性株を含む複数の HBV genotype に対して感染阻害効果を示した。これらの結果は、EGFR-NTCP 相互作用が HBV 感

染阻害の新規標的となることを示唆する。

[塩野谷果歩、岩本将士、村松正道、倉持幸司(東京理科大学)、渡士幸一]

(27) HBV 感染阻害効果を示す天然化合物の同定

天然化合物ライブラリーのスクリーニングにより、HBV 感染阻害効果を示す新規化合物を同定した。この化合物は HBV のみならず HDV の感染も阻害した。HDV は HBV と同じエンベロープを有しており、HBV と同様の宿主機構を利用して細胞へ吸着し侵入すると想定されるため、得られた化合物はこれら過程を阻害する可能性が考えられた。以上の結果から、今回得られた新規抗 HBV 天然化合物は新たな HBV 治療薬の候補となる可能性が期待される。

[小林ちさ、岩本将士、大嶋美月、倉持幸司(東京理科大学)、渡士幸一]

(28) Role of the host RNase, MCPIP1, as an anti-HBV effector downstream of an inflammatory cytokine, IL-1 β

The mechanism underlying IL-1 β -mediated viral RNA reduction remains incompletely understood. In this study, we report that MCPIP1 can reduce HBV RNA in hepatocytes. MCPIP1 expression level was higher in the liver tissue of HBV-infected patients and mice. Overexpression of MCPIP1 decreased HBV RNA, whereas ablating MCPIP1 in vitro enhanced HBV production. The domains responsible for RNase activity or oligomerization, were required for MCPIP1-mediated viral RNA reduction. The epsilon structure of HBV RNA was important for its antiviral activity and cleaved by MCPIP1 in the cell-free system. Lastly, knocking out MCPIP1 attenuated the anti-HBV effect of IL-1 β , suggesting that MCPIP1 is required for IL-1 β -mediated HBV RNA reduction. Overall, these results suggest that MCPIP1 may be involved in the antiviral effect downstream of IL-1 β .

[Li Yingfang, Que lusheng, 深野顕人、喜多村晃一、若江享祥、村松正道]

(29) 新規 HBV 薬の有効性、安全性の評価のための動物モデルの構築

HBV 創薬研究では多くの治療ターゲットとなりうる分子が見出されている。しかしながら、培養細胞レベルでの抗 HBV 効果を示しているものはあるものの、動物レベルで薬効が確認できているものは少ない。これは動物実験が高価で、難しいことによる。我々は安定的に簡便なヒト肝キメラマウス作成系を構築し、HBV 阻害剤の評価を行うことを目指している。

[楊光、青柳東代、園部円、Que lusheng、小山舞子、若江享祥、村松正道、脇田隆字、相崎英樹]

(30) B型肝炎ワクチン in vitro 力価試験の標準化

B型肝炎ワクチンの in vitro 力価試験法を確立し、性能確認を行った。評価パラメータ(真度、併行精度、特異性、直線性、範囲)についてバリデーションを行い、試薬、手順を標準化した。in vitro 試験が品質管理に有用であることを示した。

[清原知子、鈴木亮介、村松正道]

(31) B型肝炎ワクチン力価試験法の検討: in vitro 試験

昨年に引き続き、加温変性による劣化ワクチンを用いた in vivo と in vitro 試験のバリデーションを行った。劣化ワクチンの力価を現行の国家検定に準じた in vivo 試験と、in-house kit による in vitro 試験で確認した。今回使用した製剤は、4 $^{\circ}$ C 保存ワクチンに比べて劣化ワクチンの力価は in vivo、in vitro の順に、-21.0%、-84.3%であった。当検体製剤については、抗原含量の低下に比べて免疫原性の低下が緩やかではあるが、劣化ワクチンの力価低下は in vivo、in vitro いずれでも検知可能であった。

[清原知子、鈴木亮介、李天成、杉山隆一、佐藤知子、松田麻未、村松正道]

(32) 国内未承認ワクチンの力価の検討

国内未承認肝炎ワクチン(B型肝炎ワクチンを含む混合ワクチン及び新規アジュバント製剤等)について、マウス力価試験(in vivo 試験)の適用を検討した。他抗原による干渉作用、異なるアジュバントによる免疫賦活性の違いなどが懸念されたが、今回検討した製剤は、既存単味ワクチンと同様の免疫応答を誘導し、in vivo 力価試験が適用可能であることが示唆された。

[清原知子、鈴木亮介、村松正道]

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

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

[矢藤慶悟、小野寺大志(免疫部)、森山彩野(免疫部)、松田麻未、藤本陽(富士レビオ)、森石恆司(山梨大学)、高橋

宜聖(免疫部)、田村浩二(東京理科大学)、加藤孝宣、村松正道、鈴木亮介]

(34) HBV preS2 領域に対する抗体の中和活性評価

HBV preS2 領域に対する抗体が感染中和活性を有しているかを明らかにするために、preS2 発現プラスミドを BALB/c マウスに免疫した。それらマウス血清のウイルス感染中和評価を行なったところ中和活性が認められ、preS2 領域の免疫によって中和抗体が誘導されることを見出した。さらにペプチドを用いた中和活性の吸収実験を行ない、preS2 の中和エピトープ領域を明らかにした。

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

3. C 型肝炎ウイルス(HCV)に関する研究

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

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

[山田典栄、畠山修司(自治医科大学)、鈴木 智彦(大久保病院)、岡本耕(東京大学)、瀧永博之(国立国際医療研究センター)、村松崇(東京医科大学)、加藤孝宣]

(2) 抗 HCV 抗体検出用体外診断薬の評価

HCV 感染のスクリーニングには抗 HCV 抗体の検出キットが用いられる。そこで、HCV 陰性および陽性検体からなる HCV 検体パネルを用いて、市販の 12 種類の抗 HCV 抗体検出キットの性能を評価した。すべてのキットにより、HCV 陰性検体パネルの検体は全て陰性、HCV 陽性検体パネルの検体は全て陽性と診断された。このうち 7 種類のキットでは、抗体価が高、中、低の 3 段階の力価分類が可能であるが、これらのキットによる HCV 陽性検体の抗体価の分布はこれらのキット間で一致していなかった。

[村山麻子、百瀬暖佳(血液安全性研究部)、浜口功(血液安全性研究部)、加藤孝宣]

(3) HCV RNA 検出用体外診断薬の評価

HCV 感染の確定診断に用いられる HCV RNA 定量キットは、3 つのメーカーから 5 種類のキットが販売されている。そこで HCV RNA 国際標準品と HCV 陰性および陽性検体パネルを用いて、これらのキットの性能を評価した。HCV RNA 国際標準品はすべてのキットでほぼ正確に定量できた。また、すべてのキットにおいて、HCV 陰性検体パネルの検体は陰性と診断され、HCV 陽性検体パネルの検体は、すべて陽性と診断された。検体の定量値はそれぞれのキット間での高い相関がみられ、R2 値はいずれのキットの組み合わせにおいても 0.95 以上であった。測定値において、遺伝子型による影響は見られなかった。

[村山麻子、百瀬暖佳(血液安全性研究部)、浜口功(血液安全性研究部)、加藤孝宣]

(4) HCV コア抗原検出用体外診断薬の評価

HCV コア抗原の国際標準品と、HCV 陽性および陰性の検体パネルを使用して、CLEIA 法と CLIA 法の 2 種類の HCV コア抗原定量キットの性能評価を行った。国際標準品の測定では、2 つの HCV コア抗原キット間では測定値が一致しておらず、キット間の標準化がなされていなかった。また HCV 検体パネルを用いた検討では、陰性パネルの検体はすべて陰性、陽性パネルの検体はすべて陽性と診断されたが、一部のキットでは HCV 陽性検体の測定値がキットの測定下限を下回るものがあつた。HCV 陽性検体パネルの測定値の 2 つのキット間の相関は相関係数が 1.384, R2 値が 0.8754 であつた。

[村山麻子、百瀬暖佳(血液安全性研究部)、浜口功(血液安全性研究部)、加藤孝宣]

(5) HCV RNA 検出用およびコア抗原検出用体外診断薬の測定値の相関の評価

HCV RNA 検出用体外診断薬と HCV コア抗原検出用体外診断薬を用いて HCV 陽性検体パネルを測定し、その測定値の相関を評価した。HCV RNA と HCV コア抗原の測定値は、ほとんどの検体で良い相関が得られたが、一部の検体では HCV コア抗原の測定値が RNA の測定値と比較して低値となるものがあつた。その多くはコア領域 48 番目または 49 番目のアミノ酸に変異を持つ検体であつた。

[村山麻子、百瀬暖佳(血液安全性研究部)、浜口功(血液安全性研究部)、加藤孝宣]

(6) HCV に対する抗ウイルス治療後、SVR 後の病態に関する研究

C 型慢性肝炎に対する治療は IFN/DAA の治療で 9 割以上の患者に SVR が期待できる。しかしながら、発癌リスクの高い線維化進展例や高齢者の多くが SVR となる一方、IFN

と異なり DAA の肝発癌抑制作用については不明であり、今後 SVR 後の肝障害や発癌が増加することが懸念される。そこで、今後増加する SVR 後症例の肝障害・肝発癌のリスク評価と抑制法の開発のため、SVR 後の肝病態の解明と新たな検査系・対処法の確立を目指している。

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

(7) HCV 感染に伴う細胞微細構造変化の解析

HCV 感染に伴う肝組織の微細構造変化については多くの報告があるものの統一的な判断基準はない。SVR 症例の肝組織の電顕観察を進め、SVR 後 F 値が改善しない症例で優位に発がんを認めた。また、SVR 後も長期にわたりオルガネラ異常が観察され、「post-SVR syndrome」というような病態を見出した。

[青柳東代、松田麻未、市野瀬志津子(東京医科歯科大学)、和氣健二郎(ミノファーゲン製薬)、相崎英樹、脇田隆宇、村松正道]

(8) HCV 生活環に関与する HCV-NS4B 結合膜蛋白の同定と解析

NS4B 発現細胞から pull-down 法により NS4B に結合する膜蛋白を精製し、プロテオーム解析、siRNA screening を行ったところ、複製過程に関与するタンパクとして PSURF4 を見出した。SURF4 は複製複合体を含む HCV 特有の膜構造物形成に重要な役割を果たしているものと考えられた。

[Lingbao Kong(江西農業大学)、相崎英樹、脇田隆宇、村松正道]

(9) HCV 生活環に関与する HCV-NS5A 結合膜蛋白の同定と解析

NS5A 発現細胞から pull-down 法により NS5A に結合する膜蛋白を精製し、プロテオーム解析、siRNA screening を行ったところ、翻訳、複製過程に関与するタンパクとして ELAVL1 を見出した。HCV RNA と結合する ELAVL1 は NS タンパク質と結合の有無により、HCV 翻訳・複製を調整しているものと考えられる。

[ガオ ユーティン、後藤耕司(東大感染症内科)、山越智(真菌部)、小池和彦(東大消化器内科)、鈴木哲朗(浜松医科大学)、相崎英樹、脇田隆宇、村松正道]

(10) HCV 粒子形成に関与する脂肪滴周辺膜蛋白の同定と機能解析

脂肪滴周辺膜のプロテオーム解析、siRNA によるスクリーニングで、HCV 粒子形成に関与する生体膜蛋白として HSD を見出した。HSD は NS5A と結合し、HCV 粒子形成の場である脂肪滴へ導くことが示された。さらに、HSD は脂肪滴の産生にも影響を与えることが判明した。

[楊光、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)、脇田隆宇、村松正道]

(11) 肝星細胞の HCV 感染性の解析

肝星細胞の活性化が肝線維化と密接に関連していることから、HCV が肝星細胞に感染増殖するかを明らかにすることは重要な課題である。HCV 感染細胞と星細胞共培養すると HCV が星細胞に移行した。HCV RNA が複製活性を維持したまま、細胞間をエクソゾームを介して移動することを見いだした。

[在津拓馬、上田竜大、青柳東代、相崎英樹、松浦知和(慈恵医科大学)、鈴木哲朗(浜松医科大学)、脇田隆宇、村松正道]

(12) 肝炎検査陽性者のフォローアップシステムの構築

肝炎ウイルス感染を知らず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としている。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。

[菊池みなみ、相崎英樹、吉岡健太郎(藤田医科大学)、田中純子(広島大学)、脇田隆宇、村松正道]

(13) 肝炎情報の収集とデータベース構築及び情報発信

肝炎ウイルス感染の予防、肝炎ウイルスキャリア対策、肝癌死亡の減少に貢献することを目的として、肝炎ウイルス感染、病態等を含む国内外の情報等の収集とデータベースの構築、および情報の提供を行って来た。感染研ウイルス第二部のホームページから、一般のヒト、家庭医、専門家向けに、それぞれ適切な内容の情報を発信している。

[相崎英樹、脇田隆宇、村松正道]

(14) 本邦における急性 C 型肝炎のサーベイランス

感染症法に基づくサーベイランス事業で、1999 年から 2020 年の急性 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、性的感染が増加傾向を示した。

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

(15) HIV 陽性者における急性 C 型肝炎の集団発生について

2012 年、HIV 陽性同性愛者から 5 人の急性 HCV 感染例が見出された。解析の結果、感染源を共有している可能性及び、濃厚かつ繰り返す感染機会を有していた可能性が考えられたため、全国の保健所を通じて、HIV 陽性者に対し HCV 感染予防について啓発を行ったところ、一時的であるが急性肝炎の発生を抑制できた。2014、2016 年に再び発生したことから、継続的な啓発の必要性が示された。

[青柳東代、井戸田一朗(しらかば診療所)、相崎英樹、脇田隆字、村松正道]

(16) HCV 感染をモニターするための細胞の樹立

cre-loxP システムで HCV 感染により赤から緑の蛍光を変化する Huh751-RG 細胞を 11 クローン樹立した。これらの細胞に HCV-cre を感染させ、その後 DAA 処理でウイルス排除を行った。6 クローンについて HCV 未感染細胞(赤)、HCV 感染細胞(緑)、HCV 排除細胞(緑)のそれぞれ 3 種類の RG 細胞を樹立した。これら 3 種類の RG 細胞について、細胞内の微細構造を観察した。HCV 感染細胞では二重膜構造や脂肪滴構造の出現、ミトコンドリア構造の異常が観察された。HCV 排除細胞においてはこれらの構造変化は感染前の状態に回復していた。遺伝子発現変化についても解析する。

[渡邊則幸、鈴木貴也、青柳東代、杉山真也(国立国際医療研究センター)、相崎英樹、村松正道、脇田隆字]

(17) 1b 型の感染性 HCV 樹立の試み

KT9 株の Subgenomic replicon (SGR) の RNA 複製を上昇させるアミノ酸変異を導入した全長 KT9 プラスミドを構築した。これらを鋳型に RNA を合成し Huh7.5.1 細胞に遺伝子導入を行った。その後、培養上清中の HCV コア量、RNA 量を継続的に測定した。その結果、3 種の全長 KT9 コンストラクト (PL、QRLF、PLEK) について、一過性に培養上清中のコア量が検出されたが、緩やかに減少した。これらのアミノ酸変異だけでは感染性ウイルス産生には十分ではないと言える。今後は、1a 型 HCV 株で報告されている RNA 複製を上昇させるアミノ酸変異を追加することで 1b 型の感染性 HCV 樹立を試みる。

[渡邊則幸、鈴木貴也、相崎英樹、村松正道、脇田隆字]

(18) E2 モノクローナル抗体のエピトープ解析

E2-ferritin 融合タンパク質を抗原として 4 種類のハイブリドーマを樹立した。それらが産生する抗体の内 2 種の抗体

(#33、#155) に注目して解析を進めた。E2 の全領域をカバーする連続した 20 アミノ酸のペプチドを用いて 2 つの抗体の結合領域を同定した。#33 は 444-453 番目のアミノ酸領域を、#155 は 524-543 番目のアミノ酸領域を認識した。これら 2 抗体はどちらも結晶解析によって明らかになった neutralizing face に結合するが、#33 のみが感染中和活性を有する。今後はこの違いに注目して解析を進める。

[渡邊則幸、鈴木貴也、青柳東代、相崎英樹、村松正道、脇田隆字]

(19) Rodent Hepacivirus (RHV) RNA が複製する subgenomic replicon (SGR) 細胞の樹立

ヒト肝癌細胞株 Huh7.5.1 細胞、マウス肝細胞株 Hepa1-6 細胞、ラット肝細胞株 MCA-RH7777 細胞、および BRL-3A 細胞に RHV-SGR RNA を遺伝子導入後、薬剤存在下で選択培養を行い SGR 細胞の樹立を試みた。その結果、Hepa1-6 細胞および MCA-RH7777 細胞において、それぞれ 15 クローン、7 クローンの SGR 細胞を樹立した。これらの SGR 細胞では総 RNA 量 1µg あたり 7 乗から 8 乗の範囲で RHV-SGR RNA が検出された。RHV RNA が複製する SGR 細胞が樹立できた。

[池田源輝、園部円、渡邊則幸、相崎英樹、村松正道、脇田隆字]

(20) RHV の RNA 複製を上昇させるアミノ酸変異の同定

Hepa1-6 細胞を用いて樹立した Hepa1-6 SGR 細胞の 15 クローンについて、その RHV-SGR 遺伝子の遺伝子配列を決定した。その結果、クローンで共通なアミノ酸変異が 2 か所と、アミノ酸欠損が 1 か所同定された。変異の 1 つは NS3 のヘリケース領域に位置し、もう 1 つのアミノ酸変異とアミノ酸欠損は NS5A と NS5B のタンパク質切断部位付近に位置していた。特に 2372 番目のアミノ酸変異(W2372R)と Ser2376 のアミノ酸欠損に注目すると、どちらも NS5A と NS5B の切断部位付近に位置している。今後はこれらのアミノ酸変異を導入した RHV-SGR を作製してアミノ酸変異、欠損の効果を確認する。

[園部円、池田源輝、渡邊則幸、相崎英樹、村松正道、脇田隆字]

(21) 抗 HCV 活性を示す新規天然化合物の同定

抗 HCV 新規化合物を同定するため、Huh7-mCherry-NLS-IPS レポータースクリーニングシステムを用いて、110 種の天然薬物より単離された化合物および 179 種の合成化合物から抗 HCV 化合物を同定した。そのうち、山査子から単離した化合物 threo-2,3-bis (4-hydroxy-3-methoxyphenyl) -3-butoxypentan-1-ol および medioresinol は HCV 複製を抑制

し、合成化合物である Flavanoid-triazolyl hybrids はウイルス侵入を阻害することが明らかになった。

[鄭シン、若江亨祥、鈴木亮介、村松正道]

(22) HCV産生および肝細胞内脂質代謝メカニズムの解析

HCV感染Huh-7細胞およびHuh7.5.1細胞を用いた低分子化合物スクリーニングにより、新たに抗HCV活性を示す芳香属炭化水素受容体(AhR)阻害剤(flutamide誘導体)を得た。得られたAhR阻害剤は細胞毒性を示すことなく、既存のAhR阻害剤(flutamide)よりも低濃度で強くHCV産生を低下させた。得られたflutamide誘導体をHuh-7細胞に処理したところ、HCV擬似粒子の侵入およびHCVレプリコンRNAの翻訳/複製には影響を与えなかった。一方で、HCV感染に必要なレセプターの一つであるCD81を欠損するHuh7-25細胞にHCVのRNAを導入して感染性HCV粒子構築過程を評価したところ、化合物濃度依存的に感染性子孫粒子産生を抑制した。また、感染性HCV粒子構築の足場として利用される脂肪滴の産生を評価するために、HCV感染Huh-7細胞に同定したAhR阻害剤を処理したところ濃度依存的な脂肪滴の退縮が観察された。

[山崎雅子、大橋啓史、渡士幸一]

(23) 新規 HCV 薬の有効性、安全性の評価のための動物モデルの構築

HCV 創薬研究では、動物レベルで薬効が確認できているものは少ない。これは動物実験が難しいことによる。我々は安定的に簡便なヒト肝キメラマウス作成系を構築し、HCV 阻害剤の評価を行うことを目指している。

[楊光、青柳東代、園部円、Que lusheng、小山舞子、若江亨祥、村松正道、脇田隆字、相崎英樹]

(24) 患者由来C型肝炎ウイルス (HCV)の培養細胞での増殖

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の培養細胞での増殖を試みている。HCV JFH1株以外の株が増殖できるFU97細胞にHCVの増殖に重要である宿主因子Sec14L2を発現する細胞を作製し、Sec14L2を高発現する細胞株をクローニングし、新たに入手した患者由来血漿を感染させた。その結果ゲノムRNAレベルではあるが、今回初めて患者由来HCVの増殖を検出することが出来た。

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

4. E型肝炎ウイルス(HEV)に関する研究

(1) リバースジェネティック法を用いた G8 HEV の作製

in vitro で合成したキャップ構造を持つ全長 G8 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-qPCRにより測定し、ウイルス増殖を確認した。この結果はリバースジェネティック法を用いた G8 HEV の作製が成功したことが示唆された。さらに培養上清をカニクイザルに接種し、血清及び糞便から G8 HEV RNA が検出された。G8 HEV は人獣共通感染を引き起こす可能性が考えられる。

[張文静、李天成、Doan Hai Yen、網康至(動物管理室)、須崎百合子(動物管理室)、武田直和(大阪大学)、村松正道]

(2) ウサギにおける HEV の感染性及び病原性の研究

Rabbit HEV はウサギから分離された G3 HEV に属する新しい E 型肝炎ウイルスである。その病原性を明らかにするためウサギにおける rabbit HEV の感染を検討した。リバースジェネティック法を用いて作製した 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。また、rabbit HEV は一定の割合で持続感染を引き起こし、その長期観察を継続している。

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

(3) Rabbit HEV の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 と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製を試みた。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た。Rabbit HEV-LPs をウサギに免疫して高い抗体価の抗 rabbit HEV IgG が得られた。さらに VLP を接種したウサギは rabbit HEV への感染防御を示した。

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

(4) 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。HEV の感染実態を明らかにするために、日本と中国から牛と羊の血清を採取し、抗体及び HEVRNA を検査した。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した。現在、サンプルを採取し、HEVRNA の検査を検討している。

[白慧敏、柯昌文(中国広東 CDC)、村松正道、李天成]

(5) Porcine Sapelovirus (PSV) 非感受性の細胞を用いた G4 HEV の分離

Crisper/Cas9 を用いて PLC/PRF/5 のある遺伝子を取り除き、Porcine Sapelovirus に対する非感受性の細胞 N1380 を樹立した。台湾由来豚の HEV RNA 陽性且つ PSV 陽性の 10% 便乳剤を濾過除菌後、N1380 細胞に接種した。接種後細胞培養上清を継続的に採取し、RT-qPCR を用いて HEV RNA を検出し、CPE の有無と HEV の増殖を観察した。その結果、細胞 N1380 に CPE が出ず、G4 HEV の増殖が確認された。N1380 細胞は PSV 汚染された材料から G4 HEV の分離培養に有用である。

[張文静、呉芳姿(台湾 CDC) Yen Hai Doan、武田直和(大阪大学)、村松正道、李天成]

(6) Rat HEV と Rabbit HEV)における交差感染防御の検討

Rat HEV は野生ラットから分離された新型 HEV で Species C に分類されている。Rabbit HEV はウサギ由来の HEV で Species A に属する。Rat HEV と Rabbit HEV は共に人に感染性を有していることから、これらの HEV に対するワクチンの開発が必要である。そのためには種の異なるこれら二つの HEV の間における交差感染防御の有無を明らかにすることがワクチン開発の上で重要である。本実験では、ウサギに rat HEV-like particles (rat HEV-LPs)を、ラットに rabbit HEV-LPs を接種した。その結果、誘導された rabbit anti-rat HEV IgG と rabbit HEV-LPs の交差反応は rat HEV-LPs との反応より弱く、rat anti-rabbit HEV IgG と rat HEV-LPs の反応は rat HEV-LPs との反応より弱いことが明らかになった。今後抗体が誘導されたラットに rat HEV を、ウサギに rabbit HEV を接種し、ウイルスの増殖の有無により交差感染防御の可能性を評価する。

[張文静、網康至、須崎百合子(動物管理室)、武田直和(大阪大学)、村松正道、李天成]

(7)ウサギにおける新規 HEV(G5, G7, G8)の感受性

ウサギは rabbit HEV の自然宿主でありながら、G3 , G4 HEV にも感受性を有する。新型 HEV (G5, G7, G8)はイノシシあるいはラクダから分離されたウイルスである。これらのウイルスの宿主は大型動物なので動物モデルとして利用するのは困難である。新規 HEV の小動物モデルを見いだすため G5, G7, G8 HEV をウサギに接種し、その感受性を検討した。その結果、ウサギは G8 HEV に対する感受性を有することが明らかになった。

[張文静、網康至(動物管理室)、須崎百合子(動物管理室)、武田直和(大阪大学)、村松正道、李天成]

(8)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 レプリコンの複製を阻害する低分子化合物のスクリーニングを行い、ウイルス複製阻害活性を持つ低分子化合物 16 種類を同定した。さらにこの化合物について HEV 細胞複製系を用い評価したところ、6 種類の化合物で細胞毒性を示さない濃度において HEV の増殖を抑制した。今後、これら化合物の作用機序の詳細について検討すると共に HEV の複製機構や病原性発現機構の解析を行う。

[杉山隆一、石井孝司(品質保証・管理部)、鈴木亮介、脇田隆宇、村松正道]

(9)E 型肝炎の国内発生動向調査

国内における E 型肝炎の流行状況について、各地方衛生研究所、保健所と共同で分子疫学的解析を行った。2020 年の E 型肝炎報告数 450 件のうち、46 検体の遺伝子情報を集積し、解析を行った。その内訳は遺伝子型 3 が 100%であった。国内での流行は主に遺伝子型 3 であり同様の傾向であった。得られた遺伝子配列から各症例の多くは広域的な散発例と考えられたが、一部で相同性の高いクラスターが認められた。

[杉山隆一、鈴木亮介、李天成、清原知子、村松正道]

その他のウイルスに関する研究

1.新型コロナウイルス(SARS-CoV-2)に関する研究

(1) SARS-CoV-2 増殖を抑制する既存薬の発見

SARS-CoV-2 感染増殖培養系を用いて、約 300 の既存薬から SARS-CoV-2 増殖を抑制する化合物のスクリーニングをおこなったところ、ネルフィナビル、セファランチンを含む 5 つの既承認薬がウイルス増殖による細胞障害を抑制した。ネルフィナビルはウイルスの複製過程を、セファランチンはウイルスと細胞の吸着をそれぞれ阻害することが示唆された。またこれら 2 剤の併用により抗ウイルス活性の相乗効果が示され、

臨床での治療効果を数理解析で予測したところ、ネルフィナビルとセファレンチンの併用によりウイルス排除までの期間が約 5.5 日短縮された。

[大橋啓史、渡士幸一、佐宗若奈、塩野谷果歩、岩波翔也(九州大学)、広川貴次(産業技術総合研究所)、白井剛(長浜バイオ大学)、金谷重彦(奈良先端技術科学大学)、伊藤悠介(九州大学)、Kwang Su Kim(九州大学)、西岡華実、安藤秀二(ウイルス第一部)、江島啓介(インディアナ大学)、小泉吉輝(国立国際医療研究センター)、田中智博(東京理科大学)、青木伸(東京理科大学)、倉持幸司(東京理科大学)、鈴木忠樹(感染病理部)、橋口隆生(九州大学)、前仲勝実(北海道大学)、俣野哲朗(エイズ研究センター)、村松正道、西條政幸(ウイルス第一部)、合原一幸(東京大学)、岩見真吾(九州大学)、竹田誠(ウイルス第三部)、Jane A. McKeating(オクスフォード大学)、脇田隆字]

(2)抗マalaria薬メフロキンの強力な抗 SARS-CoV-2 活性

承認済みの抗寄生虫薬・抗原虫薬のスクリーニングを行い、SARS-CoV-2 感染を阻害する化合物として抗マalaria薬のメフロキンを同定した。メフロキンは SARS-CoV-2 が細胞表面の感染受容体に結合した後のウイルス侵入過程を阻害することを明らかにした。SARS-CoV-2 感染患者におけるメフロキンの薬効を数理解析により予測したところ、未治療時に比べ臨床濃度のメフロキン投与により患者体内の累積ウイルス量が 90%以上減少し、ウイルス排除までに要する期間が 6.1 日短縮された。これらの結果は、メフロキンが SARS-CoV-2 感染に対する新規治療薬候補になることを示唆する。

[塩野谷果歩、山崎雅子、岩波翔也(名古屋大学)、伊藤悠介(九州大学)、福土秀悦(ウイルス第一部)、大橋啓史、佐宗若奈、田中智博(東京理科大学)、青木伸(東京理科大学)、倉持幸司(東京理科大学)、岩見真吾(名古屋大学)、高橋宜聖(治療薬・ワクチン開発研究センター)、鈴木忠樹(感染病理部)、村松正道、竹田誠(ウイルス第三部)、脇田隆字、渡士幸一]

(3) SARS-CoV-2 増殖を抑制する酸化ステロールの同定

SARS-CoV-2 感染増殖培養系を用いて、体内で生合成されている酸化ステロールのなかで抗ウイルス活性を示す化合物が得られた。構造展開により、より低濃度でかつ強力にウイルス酸性を低下させる新規合成酸化ステロール Oxy210 が得られた。Oxy210 はウイルス RNA の複製過程を阻害し、RNA 複製の場である二重膜小胞の形成を抑制することが示唆された。

[大橋啓史、小林ちさ、佐宗若奈、片岡紀代(感染病理部)、山崎雅子、倉持幸司(東京理科大学)、村松正道、鈴木忠樹(感染病理部)、竹田誠(ウイルス第 3 部)、脇田隆字、渡士

幸一]

(4)下水検体からの SARS-CoV-2 RNA 検出方法の検討

SARS-CoV-2 は患者糞便中からも一定の割合で検出されており、下水検体を用いた環境サーベイランスの実用化が期待されているが、その手法は確立されていない。そこで下水検体からの SARS-CoV-2 RNA 回収方法の検討を行った。4 種類のウイルス濃縮方法(陰電荷膜吸着法、PEG 沈殿法、限外ろ過膜法、solid 沈殿法)を比較したところ、solid 沈殿から効率良く SARS-CoV-2 RNA を検出できることが明らかとなった。

[喜多村晃一、貞升健志(東京都健安研)、吉田弘]

(5)下水から mammalian orthoreovirus の分離

東北地方の環境サーベイランスにおいて、VeroE6 細胞の CPE と関連するウイルスが 2 株分離され、電子顕微鏡ではいずれも非エンベロープ型であることが観察された。試行した既存の PCR 検査では全て陰性であったことから、NGS 解析によりウイルスの全長配列を解析したところ、mammalian orthoreovirus の 1 型及び 2 型であることが明らかになった。

[喜多村晃一、岡智一郎、高木弘隆(安全実験管理部)、片岡紀代(感染病理部)、坂上亜希恵、植木洋(宮城県保健環境センター)]

2. Porcine Sapelovirus 被感受性の細胞を用いた本イノシシからの reovirus の分離

Crisper/ Cas9 を用いて PLC/PRF/5 のある遺伝子を取り除き、Porcine Sapelovirus に対する被感受性の細胞 N1380 を樹立した。日本由来イノシシの 10%便乳剤を濾過除菌後、N1380 細胞に接種した。接種後細胞に CPE が観察され、さらにその培養上を接種した PLC/PRF/5 細胞に同じ CPE がみられた。培養上清を塩化セシウム密度勾配遠心法で精製し、直径~85nm のウイルス粒子が観察された。NGS 解析によりウイルスの全長配列が得られ、BLAST 解析により CPE を起こしたウイルスは reovirus であることが明らかになった。

[張文静、岡智一郎、片岡紀代(感染病理部)、Yen Hai Doan、村松正道、李天成]

3. タイにおけるフラビウイルスの血清学的調査

タイ国 4 都市の健常人血清 147 検体(2011-2012 年採取)について、一回感染性フラビウイルスを使用して、6 つのフラビウイルス(DENV-1、DENV-2、DENV-3、DENV-4、JEV、および ZIKV)それぞれの中和抗体価の測定を行った。4 つの地域では DENV-1 あるいは DENV-2 に対する中和抗体保有者の割合が多く、特に 30 歳以上の血清では DENV の全ての血清型に対して中和活性を示した。一方で ZIKA に対する

中和抗体保有者の割合が比較的多い地域もあり、ZIKA が 2011 年以前にタイで流行していた可能性が示唆された。

[松田麻未、山中敦史(阪大微研)、齊藤恭子(細胞化学部)、深澤征義(細胞化学部)、花田賢太郎(細胞化学部)、松浦知和(慈恵医科大学)、塩田達雄(阪大微研)、村松正道、鈴木亮介]

4. レポーターを持つポリオーマウイルス中和試験系の確立

JC ポリオーマウイルス(JCV)は進行性多巣性白質脳症(PML)の原因因子として知られているが、日本人成人の約7割以上が JCV 抗体を持っていることから、多くの人が不顕性感染すると考えられている。ELISA による JCV 抗体価の測定が PML 発症のリスク評価に利用されているが、現状は国外に検体を輸送し測定を行なっている。そこで in-house ELISA とレポーターを持つ1回感染性粒子を利用した JCV 中和試験系を確立し神経疾患患者血清の JCV 抗体を測定し、現行の方法との相違を検証している。

[松田麻未、李天成、中西章(近畿大学)、中道一生(ウイルス第一部)、三浦善治(駒込病院)、村松正道、鈴木哲朗(浜松医科大学)、鈴木亮介]

5. Significance of APOBEC-signature mutations in Merkel cell polyomavirus, during tumorigenesis.

MCV is the causative agent of a highly aggressive skin tumor, the truncated LTag viral genome is integrated into the tumor genome; While the molecular mechanisms by which the viral genome gains the tumor-specific mutations remain to be elucidated. By using in vitro assay, sequence analysis, and bioinformatics analysis, we find that (1) A3A/B/G introduces A3-specific mutations into episomal MCV genomes in vitro. (2) The viral DNA isolated from tumors contained mutated cytosines. (3) IFN- γ , CTLs markers, was positively correlated with A3A/B/G in MCV(+) MCC. These results suggest that the interferon- γ -A3B axis plays pivotal roles in evolutionally shaping MCV genomic sequences and generating tumor-specific TAg mutations during MCC carcinogenesis.[Que Lusheng, Li yingfang, 若江亨祥, 村松正道]

6. Epstein-Barr ウイルス(EBV)感染による発癌機構の解明

EBV は上咽頭癌などの原因となる発癌ウイルスであるが、そのメカニズムについては不明な点が多い。本研究では、宿主の遺伝子変異酵素群 APOBEC3B が、ウイルス遺伝子 LMP1 により発現誘導され、宿主ミトコンドリアゲノムに変異を導入していることを示した。LMP1 および APOBEC3B の上咽頭癌での発現は頸部リンパ節転移と関連しており、APOBEC による宿主遺伝子変異が、癌進化に寄与する可能性が示唆

された。

[若江亨祥、近藤悟(金沢大学)、Que Lusheng, Li Yingfang, 鄭 シン、深野顕人、喜多村晃一、村松正道、吉崎智一(金沢大学)]

発表業績一覧

I. 誌上発表

1. 欧文発表

1) Akane Y, Tsugawa T, Fujii Y, Honjo S, Kondo K, Nakata S, Fujibayashi S, Ohara T, Mori T, Higashidate Y, Nagai K, Kikuchi M, Sato T, Kato S, Tahara Y, Kubo N, Katayama K, Kimura H, Tsutsumi H, Kawasaki Y: Molecular and clinical characterization of the equine-like G3 rotavirus that caused the first outbreak in Japan, 2016. J Gen Virol. 2021 Mar;102(3).

2) Aoki Y, Tsujimura A, Kaseda K, Okabe M, Tokuhiko K, Ohta T, O'Bryan MK, Okuda H, Kitamura K, Ogawa Y, Fujiki T, Wada M, Horie S, Nishimune Y, Tanaka H. Haprin-deficient spermatozoa are incapable of in vitro fertilization. Molecular reproduction and development. 87(5) :534-541 (2020)

3) Arita M, Fuchino H, Kawakami H, Ezaki M and Kawahara N. Characterization of a new anti-enterovirus D68 compound purified from avocado. ACS Infectious Diseases, **6**: 2291-2300, doi: 10.1021/acsinfectdis.0c00404 (2020)

4) Bai H, li W, Guan D, Su J, Ke C, Ami Y, Suzaki Y, Takeda N, Muramatsu M, Li TC. Characterization of a novel rat hepatitis E virus isolated from an Asian musk shrew (*Suncus murinus*). Viruses. 2020. 12 (7):715.

5) Balingit JC, Phu Ly MH, Matsuda M, Suzuki R, Hasebe F, Morita K, Moi ML A Simple and High-Throughput ELISA-Based Neutralization Assay for the Determination of Anti-Flavivirus Neutralizing Antibodies. Vaccines (Basel). 2020 8 (2):E297.

6) Brickley EB, Connor RI, Wieland-Alter W, Weiner JA, Ackerman ME, Arita M, Gast C, De Coster I, Van Damme P, Bandyopadhyay AS, Wright PF. Intestinal antibody responses to two novel live attenuated type 2 oral poliovirus vaccines in healthy adults in Belgium. J Infect Dis. 2020 Dec 24:jiaa783. doi: 10.1093/infdis/jiaa783. Online ahead of

7) Ejima K, Kim KS, Ludema C, Bento AI, Iwanami S, Fujita

- Y, Ohashi H, Koizumi Y, Watashi K, Aihara K, Nishiura H, Iwami S. Estimation of the incubation period of COVID-19 using viral load data. *Epidemics*. 2021 Mar 15;35:100454. doi: 10.1016/j.epidem.2021.100454.
- 8) El-Kafrawy SA, Hassan AM, El-Daly MM, Qadri I, Tolah AM, Al-Subhi TL, Alzahrani AA, Alsaaidi GA, Al-Abdullah N, Kaki RM, Li TC and Azhar EI. Seroprevalence of Dromedary Camel HEV in Domestic and Imported Camels from Saudi Arabia. *Viruses* 2020, 12 553
- 9) Fujimi TJ, Mezaki Y, Masaki T, Tajima A, Nakamura M, Yoshikawa A, Murai N, Aizawa M, Kojima S, Matsumoto Y, Aizaki H, Matsuura T. Investigation of the effects of urea cycle amino acids on the expression of ALB and CEBPB in the human hepatocellular carcinoma cell line FLC-4. *Hum Cell*. 2020 Jul;33(3):590-598. doi: 10.1007/s13577-020-00383-1. Epub 2020 May 30. PMID: 32474770
- 10) Ganganboina AB, Chowdhury AD, Khoris IM, Doong R, Li TC, Hara T, Abe F, Suzuki T, Park EY. Hollow magnetic-fluorescent nanoparticles for dual-modality virus detection. *Biosensors and Bioelectronics*. 2020. 170, 112680.
- 11) Ganganboina AB, Khoris IM, Chowdhury AD, Li TC, Park EY. Ultrasensitive Detection of Hepatitis E Virus by Electrocatalytic Water Oxidation using Pt-Co₃O₄ Hollow Cages. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2020 (45):50212-50221
- 12) Gewaid H, Aoyagi H, Arita M, Watashi K, Suzuki R, Sakai S, Kumagai K, Yamaji T, Fukasawa M, Kato F, Hishiki T, Mimata A, Sakamaki Y, Ichinose S, Hanada K, Muramatsu M, Wakita T, Aizaki H. Sphingomyelin Is Essential for the Structure and Function of the Double-Membrane Vesicles in the Viral RNA Replication Factories. *J Virol*. 2020 Sep 16;JVI.01080-20. doi: 10.1128/JVI.01080-20. PMID: 32938759
- 13) Goto S, Ishida K, Suzuki R, Morita E. Split Nano Luciferase-based Assay to Measure Assembly of Japanese Encephalitis Virus. *Bio Protoc* 2020 10 (9):e3606.
- 14) Guo Y, Yang F, Xu X, Feng M, Liao Y, He Z, Takeda N, Muramatsu M, Li Q, Li TC. Immunization of human hepatitis E viruses conferred protection against challenge by a camel hepatitis E virus. *Vaccine*. 2020 38 (46):7316-7322.
- 15) Iizuka T, Wakae K, Ono M, Suzuki T, Mizumoto Y, Kitamura K, Horike SI, Muramatsu M, Fujiwara H. Activation-induced cytidine deaminase is a possible regulator of cross-talk between oocytes and granulosa cells through GDF-9 and SCF feedback system. *Scientific reports*. 11(1) :3833-3833 (2021)
- 16) Iwamoto M⁺, Saso W⁺, Nishioka K, Ohashi H, Sugiyama R, Ryo A, Ohki M, Yun JH, Park SY, Ohshima T, Suzuki R, Aizaki H, Muramatsu M, Matano T, Iwami S, Sureau C, Wakita T, Watashi K : The machinery for endocytosis of epidermal growth factor receptor coordinates the transport of incoming hepatitis B virus to the endosomal network. *J Biol Chem*, 295(3):800-807 (2020). (⁺equally contribution)
- 17) Iwanami S, Kitagawa K, Ohashi H, Asai Y, Shionoya K, Saso W, Nishioka K, Inaba H, Nakaoka S, Wakita T, Diekmann O, Iwami S, Watashi K: Should a viral genome stay in the host cell or leave? A quantitative dynamics study of how hepatitis C virus deals with this dilemma, *PLOS Biology*, 18(7): e3000562 (2020)
- 18) Kakizaki M, Yamamoto Y, Otsuka M, Kitamura K, Ito M, Kawai HD, Muramatsu M, Kagawa T, Kotani A. Extracellular vesicles secreted by HBV-infected cells modulate HBV persistence in hydrodynamic HBV transfection mouse model. *The Journal of biological chemistry*. 295(35) :12449-12460 (2020)
- 19) Kakizoe Y, Koizumi Y, Ikoma Y, Ohashi H, Wakita T, Iwami S, Watashi K. Required concentration index quantifies effective drug combinations against hepatitis C virus infection. *Theor Biol Med Model*. 2021 Jan 9;18(1):4. doi: 10.1186/s12976-020-00135-6.
- 20) Khoris IM, Chowdhury AD, Li TC, Suzuki T, Park EY. Advancement of capture immunoassay for real-time monitoring of hepatitis E virus-infected monkey. *Anal Chim Acta*. 2020 1110:64-71.
- 21) Kitamura K, Sadamasu K, Muramatsu M, Yoshida H. Efficient detection of SARS-CoV-2 RNA in the solid fraction of wastewater. *Sci Total Environ*.2021;763:144587. doi:10.1016/j.scitotenv.2020.144587
- 22) Kong L, Aoyagi H, Yang Z, Ouyang T, Matsuda M,

- Fujimoto A, Watashi K, Suzuki R, Arita M, Yamagoe S, Dohmae N, Suzuki T, Suzuki T, Muramatsu M, Wakita T, Aizaki H. Surfeit 4 contributes to the replication of hepatitis C virus using double membrane vesicles. *J Virol*. 2020 Jan 6;94(2). pii: e00858-19. doi:10.1128/JVI.00858-19. Print 2020 Jan 6.
- 23) Li Y, Que L, Fukano K, Koura M, Kitamura K, Zheng X, Kato T, Aly HH, Watashi K, Tsukuda S, Aizaki H, Watanabe N, Sato Y, Suzuki T, Suzuki HI, Hosomichi K, Kurachi M, Wakae K, Muramatsu M. MCP1P1 reduces HBV-RNA by targeting its epsilon structure. *Scientific reports*. 10(1) :20763-20763 (2020)
- 24) Liao MH, Wu FT, Bai H, Doan YH, Yang JY, Takeda N, Muramatsu M, Li TC. Hepatitis E virus infection in 6-month-old pigs in Taiwan. *Sci Rep*. 2020 10 (1):16869.
- 25) Matsuda M, Yamanaka A, Okabayashi T, Pannamthip Pitaksajjakul P, Ramasoota P, Saito K, Fukasawa M, Hanada K, Matsuura T, Muramatsu M, Shioda T, Suzuki R. Seroprevalence of Flavivirus Neutralizing Antibodies in Thailand by High-Throughput Neutralization Assay: Endemic Circulation of Zika Virus before 2012. 2021 *mSphere* 6 (4) e00339-21.
- 26) Murakami K, Fujii Y, Someya Y. Effects of the thermal denaturation of Sabin-derived inactivated polio vaccines on the D-antigenicity and the immunogenicity in rats. *Vaccine* 38(17) 3295-3299 (2020).
- 27) Murayama A, Yamada N, Osaki Y, Shiina M, Aly HH, Iwamoto M, Tsukuda S, Watashi K, Matsuda M, Suzuki R, Tanaka T, Moriishi K, Suzuki T, Nishitsuji H, Sugiyama M, Mizokami M, Shimotohno K, Wakita T, Muramatsu M, Liang TJ, Kato T. N-Terminal PreS1 Sequence Regulates Efficient Infection of Cell-Culture-Generated Hepatitis B Virus. *Hepatology*. 2021 Feb;73(2):520-532. doi: 10.1002/hep.31308.
- 28) Nagai M, Wang Q, Oka T, Saif LJ. Porcine Sapoviruses: Pathogenesis, Epidemiology, Genetic Diversity, and Diagnosis. *Virus Res*. 286:198025. 2020.
- 29) Nagata A, Sekiguchi Y, Oi T, Sunaga F, Madarame H, Imai R, Sano K, Katayama Y, Omatsu T, Oba M, Furuya T, Shirai J, Okabayashi T, Misawa N, Oka T, Mizutani T, Nagai M. Genetic Diversity of Enterovirus G Detected in Faecal Samples of Wild Boars in Japan: Identification of Novel Genotypes Carrying a Papain-Like Cysteine Protease Sequence. *J Gen Virol*. 101(8):840-852. 2020.
- 30) Nakajima S, Watashi K, Fukano K, Tsukuda S, Wakae K, Aizaki H, Muramatsu M, Wakita T, Toyoda T. Non-nucleoside hepatitis B virus polymerase inhibitors identified by an in vitro polymerase elongation assay. *J Gastroenterol*. 2020 Apr;55(4):441-452. doi: 10.1007/s00535-019-01643-0.
- 31) Ohashi H, Wang F, Stappenbeck F, Tsuchimoto K, Kobayashi C, Saso W, Kataoka M, Yamasaki M, Kuramochi K, Muramatsu M, Suzuki T, Sureau C, Takeda M, Wakita T, Parhami F, Watashi K. Identification of Anti-Severe Acute Respiratory Syndrome-Related Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) Oxysterol Derivatives In Vitro. *Int J Mol Sci*. 2021 Mar 19;22(6):3163. doi: 10.3390/ijms22063163.
- 32) Oka T, Yamamoto SP, Iritani N, Sato S, Tatsumi C, Mita T, Yahiro S, Shibata S, Wu FT, Takagi H. Polymerase chain reaction primer sets for the detection of genetically diverse human sapoviruses. *Arch Virol*. 165(10):2335-2340. 2020.
- 33) Saito K, Fukasawa M, Shirasago Y, Suzuki R, Osada N, Yamaji T, Wakita T, Konishi E, Hanada K. Comparative characterization of flavivirus production in two cell lines: Human hepatoma-derived Huh7.5.1-8 and African green monkey kidney-derived Vero. *PLoS One*. 2020 15(4):e0232274.
- 34) Sekiguchi Y, Nagata A, Sunaga F, Oi T, Imai R, Madarame H, Katayama Y, Oba M, Okabayashi T, Misawa N, Oka T, Mizutani T, Nagai M. Multiple genotypes of enterovirus G carrying a papain-like cysteine protease (PL-CP) sequence circulating on two pig farms in Japan: first identification of enterovirus G10 carrying a PL-CP sequence. *Arch Virol*. 165(12):2909-2914. 2020.
- 35) Song C, Takai-Todaka R, Miki M, Haga K, Fujimoto A, Ishiyama R, Oikawa K, Yokoyama M, Miyazaki N, Iwasaki K, Murakami K, Katayama K, Murata K. Human Dynamic rotation of the protruding domain enhances the infectivity of norovirus. *PLoS pathogens* 16(7) e1008619 (2020).
- 36) Takagi H, Oka T, Shimoike T, Saito H, Kobayashi T,

- Takahashi T, Tatsumi C, Kataoka M, Wang Q, Saif LJ, Noda M. Human sapovirus propagation in human cell lines supplemented with bile acids. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 117 (50) 32078-32085. 2020.
- 37) Tsugawa T, Fujii Y, Akane Y, Honjo S, Kondo K, Nihira H, Kimura H, Kawasaki Y: Molecular characterization of the first human G15 rotavirus strain of bovine origin. *J Gen Virol*. 2021 Apr;102(4).
- 38) Wakae K, Kondo S, Pham HT, Wakisaka N, Que L, Li Y, Zheng X, Fukano K, Kitamura K, Watashi K, Aizaki H, Ueno T, Moriyama-Kita M, Ishikawa K, Nakanishi Y, Endo K, Muramatsu M, Yoshizaki T. EBV-LMP1 induces APOBEC3s and mitochondrial DNA hypermutation in nasopharyngeal cancer. *Cancer medicine*. 9(20) :7663-7671 (2020)
- 39) Wu FT, Oka T, Kuo TY, Doan YH, Liu LTC. Sapoviruses detected from acute gastroenteritis outbreaks and hospitalized children in Taiwan. *J Formos Med Assoc*. 2020.12. Online ahead of print.
- 40) Yato K, Onodera T, Matsuda M, Moriyama S, Fujimoto A, Watashi K, Aizaki H, Tanaka T, Moriishi K, Nishitsuji H, Shimotohno K, Tamura K, Takahashi Y, Wakita T, Muramatsu M, Kato T, Suzuki R. Identification of Two Critical Neutralizing Epitopes in the Receptor Binding Domain of Hepatitis B Virus preS1. *J Virol*. 2021 95 (5):e01680-20
- 41) Zhang H, Zheng X, Li JC, Liu QB, Huang XX, Ding Hwd, Suzuki R, Muramatsu M, Song SJ. Flavonoid-triazolyl hybrids as potential anti-hepatitis C virus agents: Synthesis and biological evaluation. *Eur J Med Chem*. 2021 Jun 5;218:113395. doi: 10.1016/j.ejmech.2021.113395. Epub 2021 Mar 31.
- 42) Zhang W, Ami Y, Suzaki Y, Doan YH, Jirintai S, Takahashi M, Okamoto H, Takeda N, Muramatsu M, Li TC. Persistent Infection with a Rabbit Hepatitis E Virus Created by a Reverse Genetics System. *Transbound Emerg Dis*. 2020 68 (2):615-625
- 43) Zhang W, Kataoka M, Yen Doan H, Wu FT, Haga K, Takeda N, Muramatsu M, Li TC. Isolation and characterization of Mammalian Orthoreoviruses using a cell line resistant to Sapelovirus infection. *Transbound Emerg Dis*. 2020 67(6):2849-2859.
- 44) Zheng X, Guo R, Liu QB, Wakae K, Watanabe N, Fukano K, Que LS, Li YF, Aly HH, Watashi K, Suzuki R, Murayama A, Kato T, Aizaki H, Wakita T, Huang XX, Yan Y, Song SS, Muramatsu M. Identification of natural compounds extracted from crude drugs as novel inhibitors of hepatitis C virus. *Biochem Biophys Res Commun*. 2021 Jun 11;567:1-8. doi: 10.1016/j.bbrc.2021.06.022.
- 45) Zhou X, Nakashima K, Ito M, Zhang X, Sakai S, Feng C, Sun H, Chen H, Li TC and Suzuki T. Prevalence and viral loads of polyomaviruses BKPyV, JCPyV, MCPyV, TSPyV and NJPyV and hepatitis viruses HBV, HCV and HEV in HIV-infected patients in China. *Sci Rep*. 2020 10 (1):17066.
- 46) Kim KS, Ejima K, Iwanami S, Fujita Y, Ohashi H, Koizumi Y, Asai Y, Nakaoka S, Watashi K, Aihara K, Thompson RN, Ke R, Perelson AS, Iwami S. A quantitative model used to compare within-host SARS-CoV-2, MERS-CoV, and SARS-CoV dynamics provides insights into the pathogenesis and treatment of SARS-CoV-2. *PLoS Biol* 19(3): e3001128 (2021)
- 47) Wu YH, Yang Y, Chen CH, Hsiao CJ, Li TN, Liao KJ, Watashi K, Chen BS, Wang LH. Aerobic glycolysis supports hepatitis B virus protein synthesis through interaction between viral surface antigen and pyruvate kinase isoform M2. *PLoS Pathog* 17(3): e1008866 (2021)
- 48) Zhuang X, Forde D, Tsukuda S, D'Arienzo V, Maily L, Harris JM, Wing PAC, Borrmann H, Schilling M, Magri A, Rubio CO, Maidstone RJ, Iqbal M, Garzon M, Minisini R, Pirisi M, Butterworth S, Balfe P, Ray DW, Watashi K, Baumert TF, McKeating JA. Circadian control of hepatitis B virus replication. *Nat Commun* 12(1): 1658 (2021)
- 49) Iwamoto M, Shibata Y, Kawasaki J, Kojima S, Li YT, Iwami S, Muramatsu M, Wu HL, Wada K, Tomonaga K, Watashi K, Horie M. Identification of novel avian and mammalian deltaviruses provides new insights into deltavirus evolution. *Virus Evol* 7(1): veab003 (2021)
- 50) Ito K, Okumura A, Takeuchi JS, Watashi K, Inoue R, Yamauchi T, Sakamoto K, Yamashita Y, Iguchi Y, Une M, Wakita T, Umezawa K, Yoneda M. Dual Agonist of Farnesoid X Receptor and G Protein-coupled Receptor TGR5 Inhibits Hepatitis B Virus Infection in Vitro and in Vivo. *Hepatology*

74(1): 83-98 (2021)

51) Akahori Y, Kato H, Fujita T, Moriishi K, Tanaka Y, Watashi K, Imamura M, Chayama K, Wakita T, Hijikata M. Establishment of a novel hepatitis B virus culture system using immortalized human hepatocytes. *Sci Rep* 10(1): 21718 (2020)

52) Watashi K. Identification and repurposing antiviral drugs against severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 with in silico and in vitro approaches. *Biochem Biophys Res Commun* 538: 137-144 (2021)

53) Yoshikawa S, Yoshio S, Yoshida Y, Tsutsui Y, Kawai H, Yamazoe T, Mori T, Osawa Y, Sugiyama M, Iwamoto M, Watashi K, Kawaguchi T, Akita T, Tanaka J, Kikuchi Y, Mizokami M, Oka S, Kanto T, Gatanaga H. Impact of immune reconstitution-induced hepatic flare on HBsAg loss in HBV/HIV-1-coinfected patients. *J Infect Dis* 223(12): 2080-2089 (2021)

54) Tsukuda S, Watashi K. Hepatitis B virus biology and life cycle. *Antiviral Res* 182: 104925 (2020)

55) Ito K, Angata K, Kuno A, Okumura A, Sakamoto K, Inoue R, Morita N, Watashi K, Wakita T, Tanaka Y, Sugiyama M, Mizokami M, Yoneda M, Narimatsu H. Screening siRNAs against host glycosylation pathways to develop novel antiviral agents against hepatitis B virus. *Hepatology* 50(10): 1128-1140 (2020)

56) Yamai T, Hikita H, Fukuoka M, Fukutomi K, Murai K, Nakabori T, Yamada R, Miyakawa K, Watashi K, Ryo A, Kodama T, Sakamori R, Tatsumi T, Takehara T. SIRT1 enhances hepatitis virus B transcription independent of hepatic autophagy. *Biochem Biophys Res Commun* 527(1): 64-70 (2020)

2. 和文発表

1) 相崎英樹, 脇田隆字, 坂本亭字, C型肝炎からの発癌機序、肝臓診療マニュアル第4版、日本肝臓学会、医学書院、東京、2020、7-9.

2) 小澤広規、井上嵩之、櫻井光、川上千春、清水耕平、宇宿秀三、田中伸子、大久保一郎、吉田弘. 環境水調査による

新型コロナウイルスの下水からの検出. *IASR* Vol. 41 p122-123: 2020年7月号.

3) 加藤孝宣. HCV ワクチンの意義と開発の見通しはあるか. *肝胆膵*, 81(1): 69-76, 2020.

4) 薩田洋輔, 奥瀬千晃, 渡邊綱正, 森田 望, 末谷敬吾, 中野弘康, 石郷岡晋也, 松永光太郎, 平石哲也, 山田典栄, 加藤孝宣, 四柳 宏, 鈴木通博, 伊東文生. IgA-HE抗体が偽陽性を示した急性肝炎の2例. *肝臓*, 62(2): 64-71, 2021.

5) 深野顕人, 渡士幸一. B型肝炎ウイルスの感染機序と創薬. *ファルマシア*. 56(12): 1079-1083. 2020

6) 村上 耕介. 小腸オルガノイドへの GII.3 ノロウイルスの侵入と胆汁酸の役割, *アグリバイオ* 2020年5月号, 研究者の広場, 2020年5月2日, 北隆館

7) 百瀬暖佳, 加藤孝宣, 浜口功. 体外診断用医薬品の性能評価 AMED 研究事業を踏まえて. *The Medical & Test Journal*, 2020年8月1日.

8) 百瀬暖佳, 加藤孝宣, 浜口功. 標準物質を用いた抗HBs抗体定量用体外診断薬の評価. *Japanese Journal of Transfusion and Cell Therapy*, 66(4):629-633, 2020.

9) 山下信子, 鈴木亮介. ウイルス性食中毒 小児科 2020 Vol.61, No. 4, 363-368

10) 山田典栄, 加藤孝宣. B型肝炎 疫学, 世界と日本. *臨床とウイルス*, 48(2): 107-113, 2020.

11) 山田典栄, 加藤孝宣. B型急性肝炎の現状と治療. *消化器・肝臓内科*, 8(2): 192-196, 2020.

12) 山田典栄, 加藤孝宣. わが国における急性肝炎の現状. *消化器・肝臓内科*, 8(6): 570-576, 2020.

13) 吉田弘. ポリオの概要と世界の状況. *バムサージャーナル*. 32(4), 13-16, 2020.

14) 渡士幸一. C型肝炎ウイルス研究のこれまでと今後の課題. *ウイルス*, 70(2): 129-134, 2020

15) 渡士幸一. 研究者のコミュニティは必要?、*実験医学*、

38(8): 1407、2020

II. 学会発表

1. 国際学会

1) Aoyagi H, Iijima H, Kikuchi M, Koyama M, Matsuda M, Watashi K, Suzuki R, Masaki T, Saito T Shimada N, Kato K, Enomoto M, Hayashi K, Tsubota A, Mimata A, Sakamaki Y, Ichinose S, Muramatsu M, Wake K, Wakita T, Aizaki H. Abnormal hepatocellular organelles are still present in patients with sustained virological response (SVR). 29th Annual Conference Asian Pacific Association for the Study of the Liver (APASL) 2020, 2020/3/4-8. Bali, Indonesia.

2) Balingit JC, Matsuda M, Suzuki R, Nguyen TTT, Nguyen CT, Takemura T, Hasebe F, Mai LTQ, Morita K, Moi ML. The impact of dengue-1 genotypes on the immune response of natural homotypic infections. 39th Annual Meeting of the European Society for Paediatric Infectious Diseases. (Online) 2021. 3. 24-29 Conference Asian Pacific Association for the Study of the Liver (APASL) 2020, 2020/3/4-8. Bali, Indonesia.

3) Fukano K, Tsukuda S, Oshima M, Ohki M, Park SY, Wakae K, Aizaki H, Wakita T, Watashi K, Muramatsu M. Identification of a novel inhibitor for hepatitis B virus internalization targeting viral receptor oligomerization. Virtual PSWC2020. Online. October. 2020.

4) Honda T, Yamada N, Murayama A, Kato A, Ito T, Ishizu Y, Kuzuya T, Ishigami M, Murakami Y, Ishikawa T, Fujishiro M, Kato T. Amino Acid Polymorphism in Hepatitis B Virus Associated with Natural Clearance of HBV DNA and HBsAg. AASLD The Liver Meeting 2020, November 13-17, Boston.

5) Ibrahim MK, Gad SA, Watashi K, Li Y, Sugiyama M, Ito M, Murayama A, Suzuki T, Kato T, Shimotohno K, Muramatsu M, Wakita T, Aly HH. MafF is a novel host restriction factor for HBV which suppresses transcription from HBV-core promoter. ASV Virtual Workshop. Jun. 19, 2020.

6) Koyama M, Yoshida S, Aoyagi H, Wakae K, Watashi K, Muramatsu M, Wakita T, Aizaki H. Development of a hepatocyte-like cell differentiation induction method using adipose-derived stem cells (ASCs). 29th Annual Conference Asian Pacific Association for the Study of the Liver (APASL) 2020, 2020/3/4-8. Bali, Indonesia.

7) Lewis MA, Cortes-Penfield NW, Tenge VR, Murakami K, Ettayebi K, Ayyar BV, Neill FH, Ramani S, Estes MK, Atmar RL. Evaluating Antiviral Agents for Human Noroviruses Using a Human Intestinal Enteroid Model. American Society for Virology 39th Annual Meeting (American Society for Virology Abstract Accepted as Oral Presentation. Meeting canceled due to COVID-19 pandemic). 2020.

8) Murakami K, Tenge VR, Karandikar U, Lin SC, Ramani S, Ettayebi K, Crawford SE, Zeng XL, Neill FH, Ayyar BV, Atmar RL and Estes MK. GII.3 human norovirus hijacks bile acid-driven cellular dynamic changes to entry human intestinal enteroids. American Society for Virology 39th Annual Meeting (American Society for Virology Abstract Accepted as Oral Presentation. Meeting canceled due to COVID-19 pandemic). 2020.

9) Murakami K, Tenge VR, Karandikar U, Lin SC, Ramani S, Ettayebi K, Crawford SE, Zeng XL, Neill FH, Ayyar BV, Atmar RL and Estes MK. GII.3 human norovirus hijacks bile acid-driven cellular dynamic changes to entry human intestinal enteroids. Virtual ASV Calicivirus & Astrovirus Workshop Presentation. June 18, 2020. Web開催.

10) Watashi K. "Analysis of hepatitis B virus life cycle and drug discovery" : Italy-Japan approaches for tackling the Covid-19 pandemic, An update on novel vaccines and therapies: web, Dec 9, 2020

2. 国内学会

1) Ibrahim MK, Gad SA, Watashi K, Li Y, Sugiyama M, Ito M, Murayama A, Suzuki T, Kato T, Shimotohno K, Muramatsu M, Wakita T, Aly HH. The IL-1b/TNF-a-inducible MafF protein is a novel anti-HBV host restriction factor that suppresses transcription from the HBV core promoter. 第16回広島肝臓プロジェクト研究センターシンポジウム. Oct. 10, 2020.

2) 岩本将土. デルタウイルスのユニークな感染伝播戦略について. ウイルス学若手研究集会 2020, P10, Web, 12月, 2020 (ポスター発表)

3) 大嶋美月. 新規 B 型肝炎ウイルス (HBV) 阻害剤の同定から HBV 侵入戦略を紐解く. ウイルス若手研究集会. 2020.12.19. オンライン.

- 4) 菊池みなみ, 吉岡健太郎, 青柳東代, 服部悟, 川部直人, 若江亨祥, 渡士幸一, 村松正道, 脇田隆宇, 沢辺元司, 相崎英樹; 自治体と医療関係者が連携した B 型・C 型肝炎ウイルス陽性者へのフォローアップシステムの構築とその有用性. 第 56 回日本肝臓学会総会. 大阪. 8 月. 2020.
- 5) 清原知子, 村松正道. A型肝炎の抗体保有率と流行状況. 第 56 回日本肝臓学会総会. 大阪(オンライン). 2020.8.28-29.
- 6) 小山舞子, 浦野日峰, 吉田進也, 青柳東代, 大崎由喜, 渡士幸一, 若江亨祥, 村松正道, 相崎英樹; 脂肪由来幹細胞(ASC)を用いた肝細胞様細胞の解析. 第 20 回日本再生医療学会総会. 2021/3/11-13 神戸.
- 7) 坂上亜希恵, 神尾彩楓, 佐々木美江, 植木洋, 高木弘隆, 岡智一郎, 上間匡. 流入下水における胃腸炎関連ウイルスの新型コロナウイルス感染症流行前後での挙動. 第 55 回日本水環境学会年会、ウェビナー、2021 年 3 月 10-12 日
- 8) 塩野谷果歩. 「SARS-CoV-2 感染阻害化合物メフロキンの同定および作用機序の解析」ウイルス学若手研究集会 2020, Web, 2020 年 12 月 18 日-19 日 (口頭発表)
- 9) 高橋知子, 藤森亜紀子, 高橋雅輝, 高木弘隆, 岡智一郎, 梶田弘子. 複数の遺伝子型が検出されたサポウイルスの集団感染事例について. 第 61 回日本臨床ウイルス学会、ウェビナー、2020 年 10 月 2-3 日
- 10) 西村順裕. ポリオ根絶計画の最終段階. 第 69 回日本感染症学会 東日本地方会学術集会 第 67 回日本化学療法学会 東日本支部総会 合同学会 2020. 東京. 2020 年 10 月 21-23 日.
- 11) 平石依里, 山岡曜子, 村上耕介, 染谷雄一. ノロウイルス非構造タンパク質 VPg が持つ推定核移行シグナルの検証. 第 32 回日本薬学会生物系薬学部会主催微生物シンポジウム 2020 年 9 月 20 日 Web 開催.
- 12) 平石依里, 山岡曜子, 村上耕介, 染谷雄一. ノロウイルス非構造タンパク質 VPg に存在する推定核移行シグナルに関する研究. 第 93 回日本生化学会大会 2020 年 9 月 Web 開催.
- 13) 廣瀬翔子, 千野梓, 早田衣里, 藤森誠, 濱田洋通, 高梨潤一, 藤井克樹; 当院入院患者におけるロタウイルス遺伝子型の検討 (2019 年) 第 52 回日本小児感染症学会学術集会、オンライン、2020 年 11 月 7-8 日
- 14) 村山麻子, 山田典栄, 村松正道, 加藤孝宣. 細胞培養における高感染性 B 型肝炎ウイルスの産生. 第 56 回日本肝臓学会総会. 8 月 28-29 日. 大阪.
- 15) 村上耕介, 片山和彦. 胆汁酸により誘発される細胞内ダイナミクス変化を用いて GII.3 ヒトノロウイルスは小腸オルガノイドに侵入する. 第 61 回日本臨床ウイルス学会, 2020 年 10 月, Web 開催.
- 16) 山崎雅子. C 型肝炎ウイルス感染時の肝細胞内脂質代謝動態の解明と新規治療薬の可能性. ウイルス学若手研究集会 2020, P9, Web, 12 月, 2020 (ポスター発表)
- 17) 山田典栄, 安田清美, 奥瀬千晃, 鈴木通博, 加藤孝宣. TAF 抵抗性 B 型肝炎慢性肝炎患者における薬剤耐性変異の解析. 第 56 回日本肝臓学会総会. 8 月 28-29 日, 大阪.
- 18) 吉田弘, 三好龍也, 小澤広規, 木田浩司, 後藤明子, 筒井理華, 高橋雅輝, 濱島洋介. 5 年間の環境水サーベイランスにより検出されたエンテロウイルス伝播の解析. 第 79 回日本公衆衛生学会. 令和 2 年 10 月 20-22 日、京都(オンライン開催)、ポスター.
- 19) 吉田弘, 三好龍也. 堺市における環境水サーベイランスにて検出されたエンテロウイルスについて. 第 79 回日本公衆衛生学会. 令和 2 年 10 月 20-22 日、京都(オンライン開催)、ポスター.
- 20) 吉田弘. 「水環境における病原性ウイルスモニタリング技術の動向」. 第 66 回日本水環境学会セミナー(オンラインセミナー). 2021.01.22、口頭.
- 21) 吉田弘. 下水中のポリオウイルスと新型コロナウイルス検査. 日本薬学会. 第 141 年会環境・衛生部会衛生試験法シンポジウム: 微生物検査による食品・環境衛生管理の新展開」(オンラインシンポジウム). 2021.03.29、口頭.
- 22) 小澤広規, 吉田弘, 大久保一郎. 環境水サーベイランスにおける新型コロナウイルスの検出. 第 79 回日本公衆衛生学会. 令和 2 年 10 月 20-22 日、京都(オンライン開催).
- 23) 李瑩芳, 村松正道. The role of MCP1 in HBV-infected

hepatocytes. 第 57 回日本肝臓学会総会、オンライン、2021.6.17. ワークショップ.

24) 李瑩芳、闕路晟、深野颯人、小浦美樹、喜多村晃一、倉知慎、若江亨祥、村松正道. MCP1P1 はエプシロン構造を介して B 型肝炎ウイルス RNA を分解する. 第 43 回日本分子生物学会年会、オンライン、(2020/12/2-4)

25) 若江亨祥、近藤悟、村松正道、吉崎智一. EBV LMP1 は APOBEC3 の発現を誘導し、ミトコンドリア DNA 変異を惹起する. 第 43 回日本分子生物学会年会、オンライン、(2020/12/2-4)

26) 渡士幸一 “Drug discovery research against COVID-19 under interdisciplinary collaboration”: 日本薬学会第 141 年会国際シンポジウム: web, March 28, 2021

27) 渡士幸一 「B 型肝炎ウイルス培養系を用いた阻害薬探索とウイルス学研究」: 日本薬学会第 32 回微生物シンポジウム: 東京、2020 年 9 月 20 日

28) 渡士幸一 「多分野共同研究による新型コロナウイルス治療薬探索・開発研究」: 創薬薬理フォーラム第 28 回シンポジウム: Web 開催、2020 年 10 月 9 日

29) 渡士幸一 「新型コロナウイルス感染実験からの増殖阻害薬の同定」: 情報計算化学生物学会 2020 年大会: Web 開催、2020 年 10 月 27 日

30) 渡士幸一 「COVID-19 治療薬探索研究における in vitro/in silico 評価系」: 日本動物実験代替法学会第 33 回大会: Web 開催、2020 年 11 月 12 日

31) 渡士幸一 「新型コロナウイルス培養系を用いた化合物スクリーニングの実際」: 第 11 回スクリーニング学研究会: Web 開催、2020 年 11 月 27 日

32) 渡士幸一 「多分野共同研究による新型コロナウイルス治療薬の探索」: 第 29 回バイオメディカル研究会: Web 開催、2020 年 12 月 4 日

33) 渡士幸一 「アカデミアと企業の共同研究による新型コロナウイルス感染症治療薬開発」: 日本ケミカルバイオロジー学会・産学連携委員会「ケミカルバイオロジーの技術革新」: Web 開催、2020 年 12 月 24 日

III. その他

1. 研究会

1) 伊藤昌彦、松田麻未、鈴木亮介、鈴木哲朗. 連続定量測定系を基盤としたウイルス侵入、複製過程の時間的動態解析. 第 6 回デザイン生命工学研究会 (オンライン)2021. 3. 5

2) 大橋啓史. 「植物由来天然物と類縁体の RNA ウイルス増殖への作用と効果の解析」: 植物バイオ研究会 2020 年度第 2 回勉強会: Web 開催: 2020 年 12 月 24 日

3) 渡士幸一. 「COVID-19 の創薬研究」: 2020 年度第 1 回宮川庚子記念研究財団研修会: 東京、2020 年 7 月 19 日

4) 渡士幸一. 「新型コロナウイルス治療薬を求めて ~ウイルス感染実験スクリーニングの現場より~」: Selleck Web Seminar: Web 開催、2020 年 8 月 27 日

5) 渡士幸一. 「新型コロナウイルス感染症治療薬探索研究の現場と、今後の課題」: 薬学教育協議会第 15 回有機化学系会議: Web 開催、2020 年 11 月 8 日

6) 渡士幸一. 「新型コロナウイルス感染症即時対応下における治療薬探索研究とその教訓」: 岩手医科大学セミナー: Web 開催、2021 年 2 月 9 日

2. 新聞取材

1) 渡士幸一. 新型コロナに 2 既存薬の併用が有効か 「ネルフイナビル」と「セファランチン」, 2020/4/22, 産経新聞

2) 渡士幸一. コロナの疑問 一定効果期待 新薬には時間 2020/7/27 読売新聞

3) 渡士幸一. Nelfinavir and cepharanthine show some potential as COVID-19 treatment in laboratory tests. 2020/4/17 Newsweek

4) 渡士幸一. Oxysterol derivatives show powerful antiviral activity against SARS-CoV-2 in vitro. 2021/2/3 NEWS MEDICAL LIFE SCIENCE

5) 渡士幸一. 新型コロナのウイルス排出量のピークは発症後 2 日程度、九大などが確認. 2021/3/23 マイナビニュース

3. ラジオ番組出演

- 1) 染谷雄一. 「下痢症ウイルスについて」 ラジオ NIKKEI 『みんなで予防！ 感染症ワンポイントアドバイス』 2020 年 10 月 7～9 日

4. テレビ報道

- 1) 渡土幸一. 新たな治療薬候補になるか 2 種類の物質発見 新型コロナ 2020/4/22 NHK
- 2) 渡土幸一. 新型コロナ治療薬「既存薬」新発見も 意外な薬の併用で”効果” 2020/5/10 フジテレビ Mr.サンデー
- 3) 渡土幸一. パンデミック第 2 波と闘う武器・世界が注目！ 日本の”コロナ治療薬” 2020/5/31 フジテレビ 池上彰緊急スペシャル！