

## 2. ウイルス第二部

### 部長 宮村達男

#### 概要

当部が対応するウイルスは主として消化器系疾患の原因ウイルスであり、A、B型肝炎ワクチン、ポリオ生ワクチンを検定、検査対象としている。

第1室の最重要課題はポリオ経口生ワクチンの検査、検定である。本年は小分製品1件の検定をおこなった。また喫緊の課題となっている不活化ワクチン早期導入に向けて、基礎実験を含めポリオワクチンの免疫学的研究を行なった。

特にわが国の食中毒の多くの原因となっているノロウイルスの研究が大きく進展した。遺伝子型の解析、レセプターの検索、ウイルス様粒子の形成、ウイルス複製に関する地道な研究も進んだ。また全国地研との連携が確立し、レファレンスセンターとしての機能を良く果たしている。平成16年年末から17年初めに全国的に多発し、パニックになりかけたノロウイルス感染症にも、冷静に対応することができた。又、新たな下痢症ウイルスであるサボウイルスの研究も大いに進んだ。

E型肝炎ウイルスの研究が着実に進行している。日本固有のE型肝炎ウイルス株の解析を進め、更に人畜共通伝染病としてのE型肝炎の位置づけが明らかになった。ウイルス中空粒子を用いた、感度の良い診断系の確立が大きく貢献した。研究班が成立し、野生動物での感染が全国レベルで調査された。

第2室では総力を挙げて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。課題はまだ地球上に残る野生株ウイルスの解析と、ワクチンの変異株によるポリオ流行の解析である。野生株の伝播は中々断ち切れないが、根絶計画はいよいよ最終段階に入った。また計画達成前後の国内及び世界レベルのワクチン戦略についてエビデンスに基づいた提言を世界に発している。また国内エンテロウイルスレファレ

ンスセンターとしてレファレンス活動、依頼検査を行なった。

第3室及び第4室のC型肝炎ウイルスの研究は着実に進んでいる。培養系でのC型肝炎ウイルス増殖の系が安定化し、RNA複製、ウイルス粒子産生に至るウイルスのライフサイクルの詳細な解析が進んでいる。

第5室の最重要課題は不活化A型肝炎ワクチン、組み換え沈降B型肝炎ワクチンの検定、検査である。本年はA型肝炎ワクチン2件、B型肝炎ワクチン7件の検定を行った。またA型肝炎ウイルスの粒子構造解析が進行している。

各室で以下のような国際的技術協力を行った。

- (1) 張 勇 (中国、中国疾病予防センター) <WHO フェロー> 平成16年3月22日~平成16年4月28日、ポリオウイルスワクチン由来株の病原性の解析
- (2) 董 文彬 (中国、四川省疾病予防管理センター) <JICA フェロー> 平成16年7月30日~平成17年6月3日、ポリオウイルス分子診断技術研修
- (3) 張 斌 (中国、上海中医薬大学) <上海中医薬大学フェロー> 平成16年11月1日~平成17年10月31日、C型肝炎ウイルスの分子生物学

研究費としては、経常研究費の他に厚生労働科学研究費補助金、ヒューマンサイエンス振興財団、ウイルス肝炎研究財団、文科省科学研究費、医薬品機構等の援助を受けた。

人事面では、名取克郎、小島勇作が平成17年3月31日をもって定年退職した。名取主任研究官はウイルス中央検査部から、小島研究員は腸内ウイルス部時代から、いずれも35年以上の永続勤務であった。宮村達男は平成16年4月1日より、ハンセン病研究センター長となり、ウイルス第二部長を併任した。

南カリフォルニア大学に長期出張していた相崎英樹主任研究官が、多くの成果を挙げて平成16年11月6日帰国、職務に復帰した。宇田川悦子主任研究官は平成16

年 10 月より平成 17 年 1 月まで米国 NIH に出張し、ノロウイルスの分子疫学の共同研究を行ってきた。カリフォルニア大学サンフランシスコ医学校に出張している染谷雄一主任研究官は出張を延長し、下痢症発症のためのイオンチャンネルの変化について研究を続けている。

## 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 (NoV) に関する研究

##### (1) ノロウイルス (NoV) と血液型物質との結合の解析

NoV のプロトタイプ Norwalk/68 株が血液型物質である H、A、Leb 型物質を認識することが報告された。しかし、NoV に属するすべてのウイルス株が同じ血液型物質を認識するわけではなく、NoV 全体の総括的な結合パターンは理解されているとは言い難い。そこで、NoV 14 株の VLPs を用い、Saliva-VLP binding assay により血液型物質との結合を検討した。その結果、同じクラスターに属するウイルス株は同じ結合パターンを示した。クラスターによって結合パターンに違いはあるものの、GI では共通して O、A 型唾液への結合が高く、GII では B 型唾液への結合が高かった。現在、Carbohydrate-VLP binding assay により糖鎖上のどの部位が VLPs との結合に重要なのかを検討中である。

[白土東子、名取克郎、小川智子、片山和彦、宮村達男、武田直和、鎌田公仁夫 (デンカ生研)]

##### (2) NoV 粒子形成機構の解析

NoV の ORF2 を組換えバキュロウイルスで発現して作製した VLP は中空である。この発現系に、NoV ゲノム全長を供給すると、VLP へのゲノムパッケージが起きる可能性がある。NoV ゲノムの 5' 末端と 3' 末端にリボザイムを組み込み、完全長の NoV ゲノムが転写されるようにした組換えバキュロウイルスを用いて細胞内にゲノムを供給したところ、中空の VLP よりも比重の重い分画にシフトした粒子が存在することが確認できた。さらに ORF3 発現バキュロウイルスや ORF1 発現バキュロウイルスを同時感染させ、形成される粒子に生じる変化をしらべている。

[松原尚子、グラント・ハンスマン、片山和彦、白土東子、武田直和、宮村達男、永田典代、田中恵子 (感染病理部)]

##### (3) 昆虫細胞を用いた NoV 粒子作成の試み

NoV U201 株の VLPs の発現に使用した組換えバキュロウイルスにクローニングされた U201 株の ORF2 からゲノム末端までの塩基配列を、PCR direct sequence で得られた天然型配列と比較すると、ORF2 (VP1) 領域に 2 カ所、ORF3 (VP2) 領域の 1 カ所、合計 3 カ所のアミノ酸変異を伴う塩基配列の違いが認められた。これらの塩基配列を用いた発現実験により、天然型配列は哺乳動物培養細胞 (293T, COS-7) でのみ、クローン型配列は昆虫細胞 (Tn5) でのみ VLPs を発現することが明らかとなった。現在、バキュロウイルス発現系、および哺乳類培養細胞発現系において NoV の VLPs 形成に重要なアミノ酸を同定することを目指して研究を進めている。

[宮下佳奈、グラント・ハンスマン、片山和彦、武田直和、宮村達男、永田典代、田中恵子 (感染病理部)]

##### (4) NoV VLP 産生機構の解析

NoV の ORF2 を組換えバキュロウイルスで発現すると、VLP を作出することができる。しかし、同じ株から作出した組換えバキュロウイルスでも、VLP を大量に産生するクローンと、細胞内には ORF2 蛋白質を大量に発現するが VLP は産生しないクローンが存在する。昨年までの研究の結果、P 領域の 1 アミノ酸残基の変異が VLP の産生能を決定していることを見いだした。免疫電子顕微鏡観察で両クローンの ORF2 蛋白質の細胞内局在を調べたところ、両者とも ORF2 蛋白質は細胞内全体に存在していたが VLP 産生クローンの場合は粒子状構造物のある密度の高いベジクルが強く染色された。VLP は ORF2t 蛋白質がベジクルに集まり、自己集合して形成されている可能性がある。

[高井 聡、松原尚子、グラント・ハンスマン、片山和彦、武田直和、宮村達男、永田典代、田中恵子 (感染病理部)]

##### (5) NoV の病原性に関する研究

NoV は非細菌性食中毒の主要な原因であると考えら

## ウイルス第二部

れている。NoV 蛋白質が真核生物の細胞に与える影響を調べるため ORF1, ORF2, ORF3 を、それぞれ発現する 3 種類の組換えバキュロウイルスを作製し、これらの感染が昆虫細胞に与える影響を調べた。感染細胞における細胞の成長速度、アポトーシスには、違いが認められなかったが、ORF1 発現細胞のネクローシス誘導は他に比べ有意に高く、ORF1 に細胞毒性のある因子が存在することが示唆された。現在、ORF1 を哺乳類細胞で発現するクローンを作成し、ORF1 蛋白質が哺乳類細胞に与える影響を調べている。

[ 片山和彦、宮下佳奈、グラント・ハンスマン、岡智一郎、宮村達男、武田直和 ]

### ( 6 ) NoV の分子系統解析

NoV のゲノム全塩基配列の分子遺伝学的解析により、構造蛋白質領域の約 250 塩基の遺伝子配列を用いた NoV のタイピング法を構築した。NoV には、2003 年現在、GI に 14 種類、GII に 17 種類の Genotype ( 遺伝子型 ) が存在する。これらのデータを日本全国の衛生研究所などで疫学調査に利用できるよう、分子系統解析のガイドムービー、データファイルを公開し配布した。また、カリシウイルスデータベースの構築を目指し、ウイルス性下痢症研究会ホームページ上にデータベースの骨格となるホームページを立ち上げた。現在、データベースとしての機能を持たせ、本格稼働させるため、さらなる全長塩基配列の蓄積を行うとともにホームページデザインの改善を進めている。

[ 片山和彦、名取克郎、宮村達男、武田直和、三瀬敬治 ( 札幌医大 ) ]

### ( 7 ) NoV 複製機構の研究

NoV には培養細胞を用いた増殖系、実験動物系が構築されていない。NoV の複製機構を解明するため、T7 RNA ポリメラーゼプロモーター配列下流に、NoV ゲノム全長を組み込んだプラスミドクローンを作製しヒト培養細胞内に導入した。同時に組換えワクチニアウイルスの共感染により T7 RNA ポリメラーゼを細胞内で発現させ、5 末端がキャッピングされた NoV ゲノム RNA を大量に細胞内に供給した。ORF1 にコードされるウイルス蛋白質が転写翻訳され、( + ) 鎖ゲノム RNA より、( - ) 鎖 RNA

を合成し、かつ約 2.6 Kb のサブゲノム RNA を合成することが明らかになった。しかし、この系では 3A-VPg 蛋白質の切断が不完全で、合成されたサブゲノム RNA から翻訳されると推定されている構造蛋白質が翻訳されず、NoV の粒子形成ができないことが明らかになった。現在、弱毒化ワクチニアウイルスを用いてワクチニアの細胞毒性を軽減し、3A-VPg 間の切断効率を増加させ、完成性粒子の形成を試みている。

[ 片山和彦、岡智一郎、石井孝司、グラント・ハンスマン、宮村達男、武田直和 ]

### ( 8 ) NoV VLP の発現と血清学的解析

VLP が発現できた NoV 株の総計は GI で 6 株、GII で 22 株となった。これらの株の遺伝学的および血清学的分類結果は、ほぼ一致し、GI は 14 のうちの 6 遺伝子型で、GII では 17 のうちの 13 遺伝子型で NoV VLP 抗原および抗血清が作製できたことになる。ゲノタイプは、異なる抗原性を持つ NoV 株の検索や分子疫学に有用であるが、実際の NoV の抗原性は VLP とこれらの抗体を用いた交差反応により明にするのが望ましい。そこで、これらの抗体と VLP を用いて、詳細な交差免疫応答試験を行った。GI と GII 間には交差反応はほとんど無いが、我々のゲノタイプ法で GII に分類されるアルファトロン株は、GI, GII 両者に交差反応を有することが明らかになった。現在、アルファトロン株の位置づけは新たなゲノタイプか、GII に分類されるのかで問題となっているが、抗原的には GI, GII の中間の性質を有しており、グループとして独立するよりも GII に内包されるゲノタイプである可能性がある。また、同じゲノタイプに分類されるウイルスでも抗体が交差反応しない株も見いだされた。今後、交差反応のデータを蓄積する必要がある。

[ 名取克郎、片山和彦、小林慎一 ( 愛知衛研 )、グラント・ハンスマン ( 東大大学院 )、永田典代、田中恵子 ( 感染病理部 )、宮村達男、武田直和 ]

### ( 9 ) 米国における食品媒介性食中毒の実態調査 ( NoV の電顕観察研究と分子疫学 )

2004 年 10 月より 2005 年 1 月まで、米国 NIH の Dr. K Green の下で米国における非細菌性嘔吐下痢症の患者

## ウイルス第二部

便材料 (500 検体) から RT-PCR, Real-Time PCR でのノロウイルス分子疫学調査を行った。RT-PCR 陽性検体に関しては全て Direct Sequencing 法でノロウイルスの確定診断を行った。検査した 500 検体で陽性と確定診断できた検体は 2% であったが、疑陽性 (ヒゲム、大腸菌の断片等) は 25% と高い価を示した。RT-PCR 産物の電気泳動法 (PCR 産物の移動度) による遺伝子の診断では疑陽性を判定できないことから、必ずシーケンス法や他の検査法により確定診断をするべきであると考え。一方、RT-PCR 陰性で使用可能な検体を電子顕微鏡検出法により観察した結果、陰性検体の 65% が陽性であった。今回使用したプライマーの検討も必要であると考え。

[ 宇田川悦子、キム・グリーン (NIH) ]

### 2. サボウイルス (SaV) に関する研究

#### (1) SaV 遺伝子の解析

SaV の全塩基配列はデータベース上にわずか 3 株しか報告されておらず、現状では SaV 遺伝子の特徴及び多様性を十分に解析できない。昨年度新たに 10 株の SaV 全塩基配列を決定したが、本年度は更に 6 株のサボウイルス全塩基配列を解析した。データベース上の配列を含め SaV は GI, GII, GIII, GIV, GV の 5 つのグループに分別できることが明らかになった。GII に分別された SakaiC12 株にはゲノムの組換えが認められた。組換えの基点は SaV ゲノムで最も高度に保存された RdRp コード領域 3 側から構造蛋白質コード領域 5 側に存在した。さらに、SaVGIV と SaVGII の間では、ゲノグループ間でのゲノムの組換えが示唆された。SaV でゲノグループ間組換えが起きている場合、ブタにのみ感染する SaVGIII とヒトに感染する他の SaV ゲノグループ間でもゲノムの組換えが起きる可能性があり、人獣共通感染症の可能性を考慮に入れて SaV の分子遺伝学、分子疫学を進める必要があると思われる。

[ 片山和彦、グラント・ハンスマン、岡智一郎、田中智之 (堺市衛研)、宮村達男、武田直和 ]

#### (2) サボウイルス ORF1 の切断点の決定

サボウイルス (SaV) Mc10 株の ORF1 の全切断部位を同定するため、予想切断部位の P1 部位に対応するアミノ酸 (E もしくは Q) を site-directed mutagenesis 法に

よって A に置換した clone を作製し、これらを鋳型にして、in vitro で 35S 標識 ORF1 全長もしくは一部領域に対応するタンパク質を発現させ、切断産物を解析した。なお、p32 と p14 間の切断点は、大腸菌リコンビナントタンパク質の切断産物の N 末端アミノ酸配列解析によって決定した。これらの結果、SaV Mc10 株 ORF1 の 6 カ所すべての切断部位 (E<sup>69</sup>/G<sup>70</sup>, Q<sup>325</sup>/G<sup>326</sup>, Q<sup>666</sup>/G<sup>667</sup>, E<sup>940</sup>/A<sup>941</sup>, E<sup>1055</sup>/A<sup>1056</sup>, E<sup>1722</sup>/G<sup>1723</sup>) を同定することに成功した。

[ 岡智一郎、片山和彦、小川智子、グラント・ハンスマン、宮村達男、武田直和 ]

#### (3) サボウイルス ORF1 の切断に影響する因子の検討

サボウイルス (SaV) Mc10 株の ORF1 の切断部位は E/ G,A もしくは Q/G であったが、これらの dipeptide は Mc10 株の ORF1 中に多く存在することから、サボウイルスプロテアーゼの切断部位認識には P1 部位以外のアミノ酸組成が関与することが示唆された。アミノ酸アライメントの結果、p32/p14 間を除き、各切断点の P4 部位にすべての SaV 株で保存されていたアミノ酸 (F もしくは Y) を site-directed mutagenesis 法によって A に置換した clone を作製し、これらを鋳型にして、in vitro で 35S 標識タンパク質を発現させ、切断産物を解析した。その結果、各切断部位の切断効率が著しく低下したことから、SaV プロテアーゼの切断部位の認識には P1 部位に加え、P4 部位のアミノ酸の組成も重要であることが明らかとなった。

[ 山本真民、岡智一郎、小川智子、片山和彦、グラント・ハンスマン、宮村達男、武田直和 ]

#### (4) 哺乳動物細胞を用いたサボウイルス様中空粒子 (VLPs) の発現

バキュロウイルス発現系では発現困難であった SaV GII Mc10 株の VLPs を作製するため、T7 RNA polymerase 遺伝子を有する組み換えワクチニアウイルスを COS-7 もしくは 293T 細胞に感染させた後、T7 promoter 配列下流に SaV Mc10 株のサブゲノムの開始コドンと推定される部位からゲノム末端までを組み込んだ plasmid を transfect し、SaV GII Mc10 株の VLPs 作製に成功した。

## ウイルス第二部

[岡智一郎、グラント・ハンスマン、片山和彦、小川智子、永田典代、宮村達男、武田直和]

(5) 大腸菌リコンビナントタンパク質を用いたサボウイルス 3C-like プロテアーゼ活性の検出

SaV Mc10 ORF1 の切断地図は NH<sub>2</sub>-p11-p28-p35 (NTPase)-p32-p14 (VPg)-p70 (Pro-Pol)-p60 (VP1)-COOH で、この切断はサボウイルス自身がコードするプロテアーゼによって行われる。プロテアーゼを含む領域を GST 融合タンパク質として大腸菌で発現させたところ、p14 と p70 間の切断点が E/A であることが明らかとなった。また、ベクター由来のライノウイルスプロテアーゼ認識部位の Q/G 間の切断が観察され、サボウイルスプロテアーゼが他のカリシウイルスと同様、E もしくは Q の直後を切断することが示唆された。

[岡智一郎、片山和彦、小川智子、グラント・ハンスマン、影山 努、宮村達男、武田直和]

(6) サボウイルス 3C-like プロテアーゼの活性発現に必要な領域の同定

SaV Mc10 株の ORF1 は 2,278 アミノ酸からなり、翻訳後、ウイルス自身のプロテアーゼにより、NH<sub>2</sub>-p11-p28-p35 (NTPase)-p32-p14 (VPg)-p70 (Pro-Pol)-p60 (VP1)-COOH に切断される。SaV Mc10 株のプロテアーゼの活性発現に必要な領域を同定するため、in vitro coupling transcription/ translation system を用いて ORF1 の C 末端 truncated forms を発現させ、発現産物の泳動パターンを解析した。その結果、SaV Mc10 株のプロテアーゼ活性の発現には少なくとも V1201 までの領域が必要であることが示された。今後、この領域内について、プロテアーゼ活性の発現に重要なアミノ酸の同定を進める。

[岡智一郎、山本真民、片山和彦、小川智子、グラント・ハンスマン、宮村達男、武田直和]

(7) SaV と血液型物質との結合の解析

サボウイルス (SaV) と血液型物質との結合の解析

SaV のレセプター分子は明らかにされておらず、血液型物質との結合についても報告がない。そこで、SaV GV の 1 株の VLPs を用い、Saliva-VLP binding assay によ

り血液型物質との結合を検討したところ、弱い結合を示した。現在、Carbohydrate-VLP binding assay により SaV と糖鎖との結合を確認中である。カリシウイルス科 Lagovirus 属のウサギ出血病ウイルスは H 型物質に結合することが知られている。また、NoV のプロトタイプ Norwalk/68 株も H 型物質を認識する。血液型物質が、カリシウイルス科に共通の結合因子として働いているのかさらなる検討が必要である。

[白土東子、グラント・ハンスマン、鄭 小凡、名取克郎、宮村達男、武田直和]

### 3. その他の研究

(1) 小型球形ウイルス紫外線照射 (UV) 不活化条件検討-2

昨年に引き続き、排水処理施設における小型球形ウイルスの UV 不活化法の検討を行った。今回は、患者材料を濃縮したノロウイルスとアストロウイルスについて UV 照射による形態変化を電子顕微鏡で観察した。患者由来濃縮ノロウイルスに直接 UV を照射し、紫外線照射後の形態変化に注目して電子顕微鏡で観察したところ、照射の程度に依存して完全粒子の数が減少し遺伝子が抜けた中空粒子が多くなる傾向が認められた。アストロウイルスでも同様の形態変化が認められたので、これらのウイルスの不活化に UV 照射は有効であると考える。

[宇田川悦子]

(2) 電子顕微鏡によるウイルス診断の世界レベルでの品質評価研究 (External Quality Assessment of EM Virus Diagnostics: EQA-EMV13)

前回に引き続き、本研究所を含む世界各国【26 カ国 93 施設 (独; 39; EU 内; 32; 極東 EU; 4 とその他 18)】に対し不活化標準ウイルスが頒布された。我々はその検体について電子顕微鏡観察でウイルスの確定診断を行い研究班へ報告した。結果として、分与された 5 検体中 5 検体の結果が一致した。この検体中一検体はウイルス粒子が存在せず、確認したところ他の研究所でも同じであった。多分輸送中等の何らかのアクシデントによりウイルス粒子が破壊されたものと考える。総ての結果は他の研究所の結果と良く一致した。[宇田川悦子]

## ウイルス第二部

### (3) ウイルス構造蛋白質の3次元解析

下痢症に関与しているカリシウイルスは小型で表面構造に特徴があるが、患者材料中のウイルス粒子は不定形を呈する事がある。そこで、培養可能なアストロウイルスを用いて、患者材料由来及び培養由来の夫々のアストロウイルスの表面構造の比較検討を3次元解析装置で行なう事を企画している。このために、ウイルス粒子表面構造のデータを収集する為の3次元解析装置の改良およびコンピュータソフトの開発検討をおこなっている。

[宇田川悦子, 中澤栄子(日立ハイテク)]

## II. エンテロウイルスに関する研究

### 1. 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、要望に応じて地研等に配付した。2004年は、ポリオウイルス標準株1セット、エンテロウイルス単味抗血清43種類、プール抗血清EP95を10セット、コクサッキーA群同定用CF腹水2セット、ポリオウイルス標準抗血清2セットを配布した。ポリオウイルスの同定および型内株鑑別検査を行政検査として行った。検査したポリオウイルスすべてがワクチン由来株であった。

(2) ポリオ実験室診断技術研修会(JICA)の開催

第14回ポリオ実験室診断技術研修会を開催した。研修期間は2005年1月25日~2月20日、研修参加者は、インド、ミャンマー、ネパール、パキスタン、パナマ、トーゴ、ジンバブエから各1名の計7名であった。ポリオウイルスの分離・同定・型内鑑別等に関する技術研修およびポリオ根絶の現状と問題点を中心とした講義を行った。

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

ア) National Polio Laboratory が存在しないラオス・カンボジアの National Polio Laboratory として実験室診断を行った。AFP 由来糞便検体からポリオウイルスの分離および同定を行った。

イ) WHO GSL として、おもにカンボジア・ラオス・ベトナム・韓国、香港、オーストラリア等で分離されたポリオウイルスについて型内鑑別あるいは塩基配列解析を行った。すべてのポリオウイルスがワクチン由来株であることを明らかにし、西太平洋地域における野生株ポリオフリーを確認した。

ウ) 中国 CDC および WHO/WPRO との共同研究により、中国貴州省で2005年に分離された1型ポリオウイルスが一定期間同地域で伝播していたワクチン由来株(cVDPV)であることを明らかにし、病原性等ウイルス学的性状について解析した。

エ) 東アジア地域における非ポリオエンテロウイルス感染症のサーベイランスおよび実験室診断を行った。特に遺伝子解析による非ポリオエンテロウイルスの実験室診断法についての研究を行った。

オ) 2004年4月22-23日に行われたポリオ実験室GSL 代表者会議(ジュネーブ)に参加した。[清水博之]

カ) 2004年7月5日-23日に中国CDC(北京)で行われた中国省級ポリオ実験室技術研修会(JICA/WHO/CCDC 主催)に講師として参加した。[吉田 弘、有田峰太郎]

キ) 2004年9月6-8日に行われたWHO ポリオ実験室担当者非公式会議(ジュネーブ)に参加した。[清水博之]

ク) 2004年9月13日-24日に行われたJICA による中国省級ラボレビュー(海南、湖南、内モンゴル)に参加した。[清水博之]

ケ) 2004年11月3-11月5日に行われたWHO による中国国家ラボレビューに参加した。[清水博之]

コ) 2004年12月15日-21日に実施したJICA タイ NIH フォローアッププロジェクト(エンテロウイルスサーベイランスおよび実験室診断強化)に参加した。[清水博之]

サ) 2005年3月に実施した省級ラボレビュー(陝西、寧夏、青海)に参加した。[吉田 弘]

シ) 2005年3月に開催された中国ポリオラボネットワーク会議に出席した。[吉田 弘]

ス) 日本におけるポリオウイルス実験室封じ込めについて周知徹底を図るため、WHO global action plan for laboratory containment of wild polioviruses (second edition) 全編の翻訳を行った。[清水博之、吉田 弘、宮村達男]

## ウイルス第二部

### (4) JICA 中国 EPI プロジェクトへの協力

JICA の実施する中国 EPI プロジェクトに関し以下の協力をを行った。

1) 2004 年 7 月 5 日 - 23 日に中国 CDC(北京)で行われた中国省級ポリオ実験室技術研修会(JICA/WHO/CCDC 主催)に講師として参加した。[吉田 弘、有田峰太郎]

2) 2004 年 8 月に行われた JICA による省級ラボレビュー(甘肅省、黒竜江省)に参加した。[宮村達男、吉倉 廣]

3) 2004 年 9 月 13 日 - 24 日に行われた JICA による中国省級ラボレビュー(海南、湖南、内モンゴル)に参加した。[清水博之]

4) 2005 年 3 月に実施した省級ラボレビュー(陝西、寧夏、青海)に参加した。[吉田 弘]

5) 2005 年 3 月に開催された中国ポリオラボネットワーク会議に出席した。[吉田 弘]

### 2. 西太平洋地域の 2004 年のウイルス分離状況

2004 年にラオス、カンボジアから送付された AFP 症例 145 例由来の糞便検体について、ウイルス分離検査及びポリオウイルスの型内株鑑別を行なった。289 糞便検体から、6 株のポリオウイルスが分離され、すべてワクチン由来株であった。81 検体から非ポリオエンテロウイルスが分離された。ラオスの AFP 患者 1 例より分離された 2 型ポリオウイルスは、型内鑑別および塩基配列解析の結果 2 型 VDPV と同定されたため、追加サーベイランスを行い、2 名の接触者から 2 型 VDPV を分離した。その他、ベトナム、香港、ニュージーランド、韓国等で AFP および非 AFP 検体から分離されたポリオウイルスの型内鑑別あるいは塩基配列解析を行なった。

[清水博之、吉田 弘、有田峰太郎、西村順裕、和田純子、宮村達男]

### 3. 世界ポリオ根絶計画に沿ったポリオウイルスに関する研究

#### (1) カンボジアにおける AFP 症例から分離された C 群エンテロウイルスの解析

昨年度、カンボジアにおける AFP 症例から新たなポリオウイルス組換え体が分離された。今年度は、カンボ

ジアにおける AFP 症例から分離された C 群エンテロウイルスの解析を行い、ポリオウイルス組換え体のゲノム中の未知の配列を与えた親株のウイルスの同定を試みた。その結果、2ABC 領域はカンボジアの CAV17 株に近縁であり、3D 領域はカンボジアの CAV18 株に近縁であることが明らかとなった。これらの配列は、プロトタイプの CAV17 もしくは CAV18 とは異なっていた。これらのことから、ポリオウイルス分離株の未知の配列は、カンボジアで蔓延している C 群エンテロウイルスに由来するものであることが強く示唆された。

[有田峰太郎、祝双利(中国 CDC)、吉田 弘、清水博之、米山徹夫、宮村達男]

#### (2) ラオスの AFP 患者および接触者から分離された 2 型ワクチン由来ポリオウイルスの解析

2004 年 10 月に急性弛緩性麻痺(AFP)を呈したラオスのワクチン未接種 1 歳児より、野生株根絶後初めて 2 型ワクチン由来ポリオウイルス(VDPV)が分離された。VP1 領域の塩基配列解析によると、Sabin 2 株と比較して 1.1 %以上の変異があったため VDPV と判定された。その後の疫学調査により、AFP 患者由来の VDPV と高い相同性を有する VDPV が 2 名の健常児から分離され、2004 年 10 月から翌年 1 月にかけて、同地域で VDPV が伝播していたことが明らかとなった。2005 年 3 月以降あらたな VDPV は検出されておらず、ラオスの VDPV 伝播は終息したことが示唆される。

[西村順裕、有田峰太郎、吉田 弘、清水博之、宮村達男、小島和暢(WHO, WPRO)]

#### (3) IPV 導入後のニュージーランドにおける OPV 分離株の解析

2002 年 2 月に IPV を導入したニュージーランドにおいて IPV 導入後に分離された OPV について解析を行い、IPV 導入後の OPV 伝播について検討した。小児科入院患者、エンテロウイルス、AFP および環境中の各サーベイランスより分離されたポリオウイルスを解析した。環境中サーベイランスからは OPV が継続して分離されたが、他のサーベイランス由来の OPV は、IPV 導入後比較的速やかに検出されなくなった。分離ポリオウイルスの遺伝子解析により、OPV 使用国からの輸入ウイルスで

## ウイルス第二部

あることが示唆された。

[ Sue Huang (IESR, New Zealand), 清水博之、宮村達男、Mark Pallansch (CDC,USA) ]

(4) 富山県で健常児より分離された2型 VDPV の解析  
平成16年度感染症流行予測調査事業の一環として行われたポリオ感染源調査において、富山衛研において健常児糞便から分離された2型ポリオウイルス分離株は、感染研での型内鑑別およびVP1領域の塩基配列解析の結果、2型 VDPV と判定された(Sabin 2株から1.2%変異)。その後、健常児および同居家族からポリオウイルスは分離されず、周囲のOPV接種率が高いことが確認され、本分離株は非AFP症例由来孤発例 VDPV と考えられた。

[ 清水博之、吉田 弘、有田峰太郎、西村順裕、宮村達男、岩井雅恵(富山衛研) ]

(5) ワクチン由来ポリオウイルスの病原性および伝播能の解析

これまで報告されたcVDPVの多くは、ポリオレセプター発現トランスジェニックマウス(TgPVR)に脳内接種した場合、野生株と同等の神経毒力を示し顕著な毒性復帰が認められる。cVDPVのin vivoにおける病原性および伝播能の違いをより詳細に検討するために、経鼻接種による神経病原性の発現および便中に排泄されるウイルス量の比較解析を行った。経鼻接種による生死および麻痺の発現による比較では、フィリピンおよびヒスパニオラで分離されたcVDPVは強毒株であるMahoney株と同等の病原性を有していた。便中へのウイルス排泄もSabin 1と比較すると顕著に増加しており、伝播能においても野生型と同等の性状を有することが示唆された。

[ 永田典代(感染病理部)、清水博之、Andi Utama、西村順裕、宮村達男、岩崎琢也(長崎大学) ]

(6) 中国貴州省で分離された1型 VDPV の病原性の解析

2005年6月から9月にかけて、中国貴州省において、2例のAFP症例および4名の接触者から計9株の1型 VDPV が分離された。VP1領域の塩基配列解析によると、それぞれのVDPV分離株は、共通の塩基置換を有してお

り、変異率(1.0-1.2%)からワクチン接種後1年程度伝播あるいは持続感染後検出されたVDPVであることが示唆された。貴州省で分離されたVDPVは、非組換え1型ポリオウイルスで、5'-UTRのreversion(480-G)が認められない等、これまで報告されている1型VDPVと異なるウイルス学的特徴を有していた。TgPVR21マウス脳内接種による神経病原性の比較解析によると、AFP患者から分離されたVDPV株は、Mahoney株と同等以上の強い病原性復帰が認められたが、接触者由来分離株は、Sabin 1株と比較すると毒性復帰がみとめられたものの、Mahoney株と比較すると弱い神経病原性を示した。

[ Zhang Yong, Xu Wenbo (中国 CDC)、西村順裕、Andi Utama、清水博之、宮村達男 ]

(7) ポリオウイルスタンパク質2BCと相互作用する宿主因子の探索

ポリオウイルスの複製は、感染細胞に特異的に形成される滑面小胞上で行われる。しかし、この滑面小胞の組成およびその生成機序については詳しい解析が行われていない。滑面小胞形成に関与するポリオウイルスタンパク質2BCをHeLa細胞内などで発現させることで、ポリオウイルス感染細胞内に形成されるのと形態的に類似した滑面小胞が形成されることが報告されている。我々はポリオウイルスの複製の場として重要なこの滑面小胞の組成、およびその生成機序を解析するため、酵母ツーハイブリッド法(split-ubiquitin system)を用いてHeLa細胞由来のcDNA libraryを対象に、ポリオウイルスタンパク質2BCと相互作用する宿主因子の探索を試み、7個のpositive cloneを得た。今後、これらのcloneについて、引き続き相互作用の解析を行う。

[ 岡智一郎、片山和彦、武田直和 ]

### 4. エンテロウイルスに関する研究

(1) 2002 - 2003年富山県内河川水から分離されたエコーウイルス13型について

2002年は全国レベルでEcho13型による無菌性髄膜炎が流行した年である。本研究では河川水から分離されたE13と検査定点から分離された株のゲノムの相関を検討した。富山県内の3河川の定点より採取された検体を濃縮処理後、Vero、MA104、RD-18S、Hep-2 cellsに接種



## ウイルス第二部

し、ウイルス分離同定を行った。同定されたウイルスのうち E13 型について Oberste 等の方法により VP1 領域の部分塩基配列を決定した。また 2002 年に検査定点において 5 例の無菌性髄膜炎患者から分離、同定された E13 についても同様に塩基配列を決定した。環境分離株と患者分離株の塩基配列の違いは 1% 以下であり同一のクラスターを形成した。2002 年に国内で分離された他の E13 患者分離株と比較したところ最大 3% 以下の違いに過ぎず同一のゲノタイプであると考えられた。以上の結果から環境水ウイルスサーベイランスは集団内に循環するウイルスを追跡する手法として有意義であると考えられる。

[ 岩井雅恵、松浦久美子、永井美之( 富山衛研) 吉田 弘 ( 感染研) ]

### ( 2 ) モンゴル国における家族内エンテロウイルス感染のリスクファクターに関する研究

2003 年夏に 30 家族、計 122 人の健常者から 5 週間にわたり便を採取しエンテロウイルスのウイルス分離を行った。また同定と平行して遺伝子解析を行い分離株同士のゲノムの相関を解析した。また同時に感染のリスクファクターについてアンケート調査を実施し感染様式について分析を行った。分離同定されたウイルスは E30,33,12,25、CA2,4,10,24 であった。ゲノムの比較の結果、ウイルスが分離された対象者のうち 54% は家族内感染である可能性を示した。感染のリスクファクターとして台所、浴室、トイレゴミ捨て場の汚染が示唆され、手洗いが感染防御に有効であることが明らかになった。

[ 倉光美奈子、黒岩宙司(東大)、吉田 弘 ( 感染研) ]

### ( 3 ) エンテロウイルス 71 弱毒株の神経毒性に関する解析

これまでに、エンテロウイルス 71(EV71)の感染性 cDNA クローンを構築し、温度感受性変異を導入した S1-3 変異株が、サルにおいて弱い神経毒性を示すことを報告した。そこで、今回は、S1-3 変異株の中樞神経への感染過程に介する解析を行った。その結果、S1-3 変異株は、静脈内接種後、まず初めに腰髄で複製することが示唆された。また、腰髄における複製が、振戦等の臨床症状として顕れるための因子として、年齢が重要で

あることが示唆された。今後、S1-3 株を接種したサルの血清を用いて、遺伝子型の異なる EV71 分離株に対する中和能に関する解析を行う予定である。

[ 有田峰太郎、永田典代、網 康至、須崎百合子、清水博之、岩崎琢也、佐多徹太郎、宮村達男 ]

### ( 4 ) エンテロウイルス 71 感染マウスモデルの作製

マウスにおけるエンテロウイルス 71 ( EV71 ) 感染モデルにおいてはウイルス側の因子及びマウス側の因子の両方が必須であることが知られているが、その本質的な因子の性質については明らかにされていない。そこで、マウスにおける EV71 感染に必要な因子の同定を目的として、EV71 分離株の一つである NAGOYA 株を用いて、SCID マウスを用いた感染モデルの作製を試みた。その結果、SCID マウスへ持続感染能を有する変異株を分離することに成功した。この変異株は、親株と比べ培養細胞における増殖能が低下していた。今後、EV71 変異株の持続感染能に必要な因子の同定をさらに進める予定である。

[ 有田峰太郎、網 康至(動物管理室)、清水博之、宮村達男 ]

### ( 5 ) エンテロウイルス 71 に対するモノクローナル抗体のエピトープ解析

GST 蛋白質とエンテロウイルス 71 キャプシド蛋白質の融合蛋白質の大腸菌発現を試みている。これを用いることにより、当室にて作製されたエンテロウイルス 71 粒子に特異的なモノクローナル抗体のエピトープ解析が可能になると思われる。

[ 西村順裕、田野良夫(日本ポリオ研究所)、清水博之、宮村達男 ]

### ( 6 ) EV71 特異的レセプターの探索

当室にて EV71 粒子に特異的なモノクローナル抗体が作製された。そのモノクローナル抗体を用いて EV71 結合レセプターの同定を試みている。その手順は以下の 4 ステップである。1) エンテロウイルス非感受性細胞に感受性細胞由来ライブラリーを発現。2) 抗 EV71 抗体を介して EV71 粒子をシャーレに固定。3) 1) のライブラリー発現細胞を 2) のプレートでパンニング。4)

プレートに残った細胞から cDNA を単離・同定。現在、各種細胞の EV71 感受性について解析している。

[ 西村順裕, 有田峰太郎, 清水博之, 宮村達男 ]

#### ( 7 ) 東アジアの EV71 の分子疫学解析

近年東アジア諸国では、大規模な手足口病流行の際に死亡例を伴う重篤な中枢神経疾患の多発が報告されている。マレーシア、台湾、日本を含めた多くの地域で、genogroup B および C の EV71 が同時に伝播している。それぞれの genogroup をより詳細に分類した subgenogroup の分布によると、1990 年代後半以降、genogroup B3 および B4、また、genogroup C1 および C2 が、東アジアの多くの地域で分離されている。日本では、1970 年代から 2000 年代にかけて、genogroup C3 を除く、ほぼすべての genogroup の EV71 が分離されているが、最近多く分離される遺伝子型は、genogroup B4 および genogroup C2 である。東アジア地域では、多様な遺伝子型を有し、他の地域で分離されるウイルスと分子疫学的関連性の高い EV71 が多く分離されている。他のエンテロウイルスと同様、EV71 においても地域固有のウイルス伝播は例外で、広範囲な多くの地域間で頻繁にウイルス伝播が起きていることが示唆される。

[ 清水博之、ANDI UTAMA、宮村達男、Napa Onnimala, Yaowapa Pongsuwanna (NIH, Thailand) ]

#### ( 8 ) HEV-A に属する新規エンテロウイルスの遺伝子解析

2002 年にカンボジアの AFP 患者から分離された同定不能な非ポリオエンテロウイルスの遺伝子解析を行ったところ、Human enterovirus species A (HEV-A) に属する、新規エンテロウイルス(エンテロウイルス 90; EV90) であることが、明らかとなった。カンボジアの EV90 分離株は、オランダの HIV-1 陽性者糞便検体から同定された EV90 分離株と 5'UTR、カプシド、非構造蛋白質等すべてのゲノム領域において高い相同性を示し、世界の広い地域での伝播が示唆された。EV90 の 5'UTR は、既知の HEV-A 株と異なる系統関係を示し、HEV-C および HEV-D と高い相同性を有していた。

[ Chen Li (中国 CDC)、清水博之、ANDI UTAMA、宮村達男、Peter van den Broek (Primagen Holding) ]

### III. 肝炎ウイルスに関する研究

#### 1. A 型肝炎ウイルスに関する研究

##### ( 1 ) LAMP 法による HAV の迅速診断法の試み

LAMP(Loop-mediated Isothermal Amplification)法を利用して A 型肝炎の迅速診断法の開発を試みた。増幅する鋳型として B 型の HAV 株 KRM238 から抽出した RNA を使用し、高率良く RNA を増幅する 5' 非翻訳領域のプライマーセットを作製した。今後、他の遺伝子型株への適用を図り、フィールドに応用できるシステムを確立する予定である。

[ 米山徹夫、下池貴志、清原知子、戸塚敦子、佐藤知子、\*太田嘉則 (\*栄研化学) ]

##### ( 2 ) 無血清培地を用いた培養細胞による A 型肝炎ワクチン製造の開発

無血清培地 VP-SFM で A 型肝炎ワクチン作製用細胞 GL37 の増殖の改善のため、10 種類の物質でそれぞれコーティングしたプレートで GL37 を継代し、その増殖を観察した。その結果、三種類のプレートでワクチン作製用 FBS 入り培地-未処理プレート(FBS-未処理プレート) よりも細胞の増殖が良くなった。しかしながら、HAV の増殖はどのプレートにおいても FBS-未処理プレートよりも悪かった。今後 VP-SFM 培地に欠ける細胞増殖に必要な因子の探索を検討したい。

[ 下池貴志、戸塚敦子、武田直和、田代真人(ウイルス第三部)、宮村達男 ]

##### ( 3 ) 抗原捕捉 PCR もしくは LAMP を目的とした抗 HAV 抗体固相化磁気ビーズの作製

市販の抗マウス抗体固相化磁気ビーズに抗 HAV 単クローン抗体を結合し、異なる遺伝子型のウイルスを吸着させ、回収した HAV 抗原量を ELISA で測定した。いずれのウイルスに対しても回収率の良い抗体を選定し、固相化条件を決定した。今後は PCR、LAMP への実用化を検討する。

[ 清原知子、戸塚敦子、米山徹夫 ]

##### ( 4 ) HAV 感染、増殖におけるインターフェロン(IFN) の影響

## ウイルス第二部

HAV を効率よく増殖する培養系の開発の為、同じ由来でありながら HAV 増殖効率の異なる細胞 GL37 と GL17 について IFN の影響を調べている。HAV は細胞に感染すると抗 IFN 活性を示し細胞の IFN 産生を抑制する。GL37 も GL17 も HAV 感染後の培養上清からは IFN は検出されず感染後の HAV 増殖に対する IFN の関与は差がないと推察された。また、GL17 のみ、非感染下で微量の IFN を産生しているという知見を得た。これらのことから感染前の IFN の動態が GL37 と GL17 の HAV 増殖の差に関与していると考え検討を行っている。

[ 清原知子、戸塚敦子、小池智 ( 都神経研 ) ]

### 2 . C 型肝炎ウイルス ( HCV ) に関する研究

#### ( 1 ) 三次元培養細胞で産生された HCV 様粒子の感染性解析

HCV 全蛋白を発現し HCV-RNA 複製が持続的に複製する RCYM1 細胞を三次元培養することにより HCV 様粒子が産生され細胞外へ分泌される。この HCV 様粒子を含む培養上清を Huh7 細胞へ添加したところ、72 時間後に HCV-RNA および蛋白発現が認められた。一方、subgenomic-HCV レプリコン細胞の培養上清の場合はこのような発現は観察されなかった。HCV 様粒子の感染は抗 E2 抗体及び NOB 抗体 (E2 蛋白と細胞との結合を阻害する)により抑制されるため、エンベロープ依存的な感染であることを確認した。

[ 村上恭子、勝二郁夫、鈴木哲朗、宮村達男 ]

#### ( 2 ) 温度感受性ゲル TGP で三次元培養した HCV 発現細胞の形態学的解析

TGP で三次元培養した RCYM1 細胞の微細構造を透過型および走査型電子顕微鏡によって観察した。単層培養細胞に比べ細胞表面の微絨毛がよく発達し、また、微小胆管様の構造が細胞間に観察された。これらの特徴はラジアルフロー型バイオリアクター ( RFB ) 培養で認められたものと一致しており、三次元培養細胞が生体肝組織に近いことを示している。

[ 村上恭子、石井孝司、吉崎佐矢香、相崎英樹、勝二郁夫、鈴木哲朗、宮村達男 ]

#### ( 3 ) 三次元培養細胞内での HCV 様粒子の形態観察

HCV 様粒子が産生される RCYM1 細胞の TGP 培養系で、細胞内の HCV 様粒子の形態、存在様式を解析した。RCYM1 細胞内には小胞体膜上及び小胞内に 50nm 程度の粒子様構造物が観察された。免疫電子顕微鏡観察でこの構造物が anti-core 及び anti-E1 抗体と反応したことから、HCV 様粒子であることが示された。

[ 村上恭子、石井孝司、吉崎佐矢香、相崎英樹、勝二郁夫、鈴木哲朗、宮村達男 ]

#### ( 4 ) TGP 三次元培養細胞を利用した HCV 粒子産生系の薬剤評価への応用

TGP 三次元培養細胞を用いた HCV 粒子産生系が新規薬剤評価系として利用可能であるか否かについて検討した。HCV 治療薬として使用されているインターフェロン (IFN) またはリバビリン (RBV) を同培養系に添加し、培養上清中の HCV 粒子密度に相当する 1.18g/ml 分画中の HCV-RNA 量を測定した。HCV-RNA 量は約 90% まで減少することがわかった。HCV 粒子産生阻害作用を指標とした新たな抗 HCV 薬の評価系として有用であることが示された。

[ 村上恭子、勝二郁夫、鈴木哲朗、宮村達男 ]

#### ( 5 ) RFB 三次元培養システムを利用した HCV 粒子産生系の薬剤評価への応用

RFB を利用した RCYM1 細胞の三次元培養系では培養上清中に HCV 粒子が放出される。この培養系が抗 HCV 薬評価系として利用可能であるかを検討した。RFB に RCYM1 細胞を導入後、100IU/ml のインターフェロン (IFN) を培地中に添加し、2 週間培養した。経時的に培地を回収し、HCV-RNA 量を測定したところ、細胞あたりの HCV 粒子産生量が IFN 処理によって顕著に減少することを見出した。また、IFN 添加 7 日目以降では細胞増殖の亢進を観察した。IFN により HCV が除去されたことで細胞増殖能が回復した可能性が考えられた。

[ 村上恭子、石井孝司、吉崎佐矢香、相崎英樹、勝二郁夫、鈴木哲朗、宮村達男 ]

#### ( 6 ) 三次元培養系による HCV 粒子作製の効率化

RCYM1 細胞の三次元培養系で HCV 様粒子の産生、細胞外への分泌を見出しているが、ウイルス産生効率を

## ウイルス第二部

向上させるため、宿主細胞としてセンダイウイルス C 蛋白発現により IFN 非感受性となった Huh7 細胞 (H-SeVC-36) 等の様々な IFN 応答抵抗性細胞での HCV 複製を検討している。これらの細胞株に種々の遺伝子型のダイシストロニック HCV ゲノム RNA を導入し、より複製効率の高い細胞の樹立を試みている。

[ 村上恭子、勝二郁夫、鈴木哲朗、宮村達男 ]

### (7) 感染性クローン H77 の REB/HCV 感染系における増殖のメカニズムの解析

我々はチンパンジーで感染性を示した HCV 分子クローン H77 を RFB で培養した FLC4 細胞に導入すると、培養上清中に、長期にわたって安定的に HCV 粒子を産生すること、その粒子が感染性も示すことを見出している。この RFB で増殖している HCV RNA の塩基配列を調べたところ、数カ所に遺伝子変異が集積していた。これらの遺伝子変異が FLC4 細胞での HCV RNA の複製における影響を調べるため、これらの遺伝子変異を導入したレプリコン遺伝子を用いた実験を行っている。

[ 相崎英樹、村上恭子、吉崎佐矢香、石井孝司、鈴木哲朗、宮村達男 ]

### (8) RFB による HCV 遺伝子型 2a 発現細胞 (IH fmp) の三次元培養検討

HCV 遺伝子型 2a の full-length dicistronic RNA を保持する Huh7 細胞 (IH fmp) を RFB 培養しウイルスを大量産生させるため、まず IH fmp 細胞の培養条件の最適化を検討した。遺伝子型 1b 細胞 (RCYM1) と同じ条件で培養したところ必ずしも細胞増殖は良好とは言えなかったため、播種細胞数、培地等を変更したところ、細胞増殖の指標となる酸素消費量とグルコース消費量は共に経時的な増加を示した。

[ 吉崎佐矢香、石井孝司、村上恭子、相崎英樹、\*脇田隆字、勝二郁夫、鈴木哲朗、宮村達男 (\*都神経研) ]

### (9) RFB 培養による遺伝子型 2a HCV 粒子の産生

HCV 遺伝子型 2a クローン JFH1 は培養細胞においてウイルス粒子を産生することが報告されている。そこで RFB を用いた三次元培養において HCV 粒子の産生を試みた。JFH1 の full length genome から作製した RNA

を Huh7 細胞にトランスフェクションし、RFB による三次元培養を行った。培養上清を濃縮し HCV-RNA を定量したが、これまでのところ HCV 粒子産生を示す知見は得られていない。現在、遺伝子導入、RFB 培養条件を詳細検討中である。

[ 吉崎佐矢香、石井孝司、村上恭子、相崎英樹、\*脇田隆字、勝二郁夫、鈴木哲朗、宮村達男 (\*都神経研) ]

### (10) Pol I プロモーター/ターミネーター系を用いた感染性 HCV 粒子の作成

HCV 全長の遺伝子を RNA polymerase I プロモーター/ターミネーター間に挿入したプラスミドを作成し、ヒト肝臓由来の細胞に導入すると、細胞内で HCV ゲノム RNA の合成およびウイルス蛋白の発現が確認できた。さらにその培養上清中にもウイルス粒子の分泌が確認された。ショ糖密度勾配遠心法により HCV 粒子の密度を調べたところ、約 1.15-1.18 g/ml であった。さらにこの上清を限外濾過膜にて濃縮し、Huh7.5.1 細胞へ感染させたところ、ウイルスの感染、複製が確認された。現在、ウイルス粒子の電子顕微鏡による観察を行っている。

[ 鈴木亮介、近藤円香、政木隆博、松田麻未、相崎英樹、村上恭子、\*脇田隆字、鈴木哲朗、宮村達男 (\*都神経研) ]

### (11) HCV レプリコンを持つ細胞への HCV 構造蛋白の供給による粒子形成

HCV レプリコン細胞に HCV 構造蛋白を供給することで、HCV RNA がパッケージングされたウイルス様粒子を形成できる可能性がある。HCV subgenomic replicon Huh7 細胞株 (5-15) に、HCV 構造蛋白を発現する組換え DIIs を感染させ、1 週間培養後上清及び細胞を分画して調べたところ、蔗糖密度勾配遠心分画で構造蛋白、HCV RNA は同一の密度画分に存在した。またこの RNA は RNase に抵抗性であったことから、レプリコン RNA を含む HCV 粒子形成が示唆された。

[ 張斌、石井孝司、村上恭子、鈴木亮介、吉崎早矢香、鈴木哲朗、宮村達男 ]

### (12) HCV コア蛋白によるヌクレオキャプシド様粒子の作成

## ウイルス第二部

HCV コア蛋白によるヌクレオキャプシド形成機構を解析し、コア蛋白のセルフアセンブリー、RNA パッケージングには N 末端側に 3 カ所存在する塩基性アミノ酸クラスター (aa 6-14, 39-44, 59-72) が重要であることを見出した。現在、HCV ゲノム発現系を用いてコア蛋白の変異が粒子形成へ及ぼす影響を解析している。

[坂本真一郎、松田麻未、白木和子、鈴木亮介、\*松浦善治、鈴木哲朗、宮村達男 (\*大阪大学微研)]

(13) バキュロウイルス 昆虫細胞由来試験管内発現系を利用した HCV ヌクレオキャプシド産生

バキュロウイルスベクターを昆虫細胞での HCV 蛋白発現系で細胞内にヌクレオキャプシド様粒子を産生することが可能であるが、発現蛋白質の可溶化が容易でないことから粒子の単離が難しい。そこで、最近開発されたバキュロウイルス 昆虫細胞由来の in vitro translation system でコア遺伝子を発現させ、蔗糖密度勾配遠心にかけたところヌクレオキャプシドと考えられる密度ピークが検出された。現在この画分の性状を解析中である。

[張斌、石井孝司、鈴木亮介、坂本真一郎、吉崎早矢香、鈴木哲朗、宮村達男]

(14) 複製複合体を用いた HCV ゲノム複製機構の解析

HCV ゲノム複製活性を保持したまま、HCV 非構造蛋白と宿主因子からなる HCV ゲノム複製複合体を粗精製し、その解析を目指した。まず、初めて 5-bromouridine 5'-trephosphate を用いて、レプリコン細胞内で複製している HCV を組織染色することに成功した。更に、無細胞系で HCV 複製活性を検出できる系を構築した。これらの方法を用いた解析から、HCV 非構造蛋白と宿主因子からなる HCV ゲノム複製複合体は lipid raft を含む界面活性剤不溶性画分に内包されていることを見いだした。

[相崎英樹、\*マイケル・ライ(\*南カルフォルニア大学)]

(15) HCV 複製における hVAP-33 の役割

Human vesicle-associated membrane protein-associated protein of 33 kDa (hVAP-33) の HCV 複製における役割について研究した。hVAP-33 は NS5A, 5B と結合し、膜の lipid raft 上に引き込み、ゲノ

ム複製複合体を形成する働きがあることを示した。更に、最近の研究では、HCV レプリコン細胞での HCVRNA の適応性変化にこの hVAP-33 が重要な役割をしていることが証明され、注目されている。

[相崎英樹、\*マイケル・ライ(\*南カルフォルニア大学)]

(16) HCV 複製における PTB の役割

polyprimidine tract-binding protein (PTB) は HCV RNA の 5' 末端や 3' 末端などに結合し、HCV の翻訳に影響を与えていることが知られている。我々は、この PTB がゲノム RNA 複製に影響を与えている可能性について調べた。PTB は lipid raft を含む界面活性剤不溶性画分に存在する HCV ゲノム複製複合体に含まれ、ウイルス RNA 合成に必須な蛋白であることを示した。

[相崎英樹、\*マイケル・ライ(\*南カルフォルニア大学)]

(17) プロテオーム解析による HCV 複製調節因子の検索(1)

HCV ゲノム複製複合体は界面活性剤不溶性画分に内包されていると考えられている。HCV ゲノム複製に必要な宿主因子を同定し、ウイルス複製のメカニズムを明らかにするため、レプリコン細胞と Huh-7 細胞から界面活性剤不溶性画分を粗精製し、二次元電気泳動により各蛋白の量的比較を行い、HSP90、TRiC、HSC70 など約 50 種類の蛋白スポットがレプリコン細胞で有意に検出された。そこで、レプリコン細胞を HSP90 の特異的阻害剤 Geldanamycin で処理したところ、ウイルス複製を強く抑制したことから、HSP90 が HCV 複製に関与していることが示唆された。現在、その他の宿主因子についても検討中である。

[相崎英樹、松田麻未、井上 寧、\*マイケル・ライ、鈴木哲朗、宮村達男 (\*南カルフォルニア大学)]

(18) プロテオーム解析による HCV 複製調節因子の検索(2)

HCV ゲノム複製機構を明らかにするため、RCYM1 細胞から lipid rafts/caveolae 画分を粗精製し性状解析を行った。また、HCV ゲノム複製と細胞増殖との相関を調べ、細胞が対数増殖期にあるとき複製活性が高いことを見出した。これらの知見を基に、HCV ゲノム複製を調

## ウイルス第二部

節する宿主因子を同定するため、対数増殖期及び定常期の RCYM1 細胞からそれぞれ複製複合体を分離し二次元電気泳動により各蛋白の量的比較を行い、約 10 種類の蛋白スポットに有意差を認めた。MALDI-TOF-MS 解析を用いて、それらの宿主蛋白を同定した。対数増殖期の複製複合体分画に分子シャペロンが多く含まれるという特徴が見出された。

[ 井上 寧、松田麻未、村上恭子、相崎英樹、鈴木哲朗、宮村達男 ]

(19) HCV 複製に分子シャペロン TRiC および HSC70 が与える影響

HCV ゲノム複製機構に關与する宿主蛋白として、分子シャペロン TRiC ( T-complex polypeptide 1 ring complex ) の subunit である CCT5 および HSC70 ( heat shock cognate protein 70 ) を同定した。これらに対する siRNA によって発現を抑制したところ、HCV 複製が 30 ~ 40% 低下した。薬剤による TRiC 誘導により HCV 複製効率は上昇した。また、CCT5 が HCV NS5B 蛋白と結合することを明らかにした。以上より、分子シャペロン特に TRiC が HCV 複製に強く關与していることが示唆された。

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

(20) HCV の複製および翻訳に対する Pin1 の影響

Pin1 はリン酸化蛋白に結合し、その蛋白を異性化させる機能を持ち、これまでに細胞周期や癌化に重要な役割を担っている事が報告されている。この Pin1 が、HCV の翻訳または複製へ關与している可能性について解析した。その結果、HCV レプリコン細胞において複製効率に対する影響は認められなかったが、dicistronic reporter assay 系において Pin1 の過剰発現による HCV IRES の翻訳効率の上昇が認められた。

[ 鈴木亮介、鈴木哲朗、宮村達男 ]

(21) HCV NS5A 蛋白のウイルス RNA 複製における役割

NS5A 蛋白を部分欠損またはリン酸化部位を点変異させた HCV RNA レプリコンを用いた複製解析から、HCV

ゲノム複製に影響する NS5A 領域が明らかにされた。NS5A 内の多くのリン酸化部位の変異によって HCV 複製は劇的に低下した。また、これらの NS5A 変異は HCV IRES 活性には影響を与えなかった。NS5A 変異が HCV 複製複合体形成に及ぼす影響を membrane floatation assay によって解析中である。

[ 坂本真一郎、根岸英雄、相崎英樹、鈴木亮介、村上恭子、\*松浦善治、鈴木哲朗、宮村達男 (\*大阪大学微研) ]

(22) プロテアソームによる HCV コア蛋白の選択的分解における PA28 の役割

HCV コア蛋白はプロテアソームによってユビキチン依存的及び非依的に分解される可能性を示してきた。後者の機構にはプロテアソーム活性化因子 PA28 との結合が重要であることが、ユビキチン鎖が形成されない変異コア蛋白が PA28 の発現によって不安定化し、PA28 結合領域を欠損させた場合はそのような不安定化は観察されない、などの知見から明らかとなった。

[ 鈴木亮介、\*森石恆司、石井孝司、白倉雅之、勝二郁夫、\*松浦善治、鈴木哲朗、宮村達男 (\*大阪大学微研) ]

(23) HCV NS2 結合宿主因子の探索

HCV NS2 蛋白に結合する宿主因子を探索する目的で、Flag-tag 付加 NS2 蛋白を恒常的に発現するほ乳動物細胞株を樹立し、この細胞から Flag 抗体を用いて NS2-宿主因子複合体を調製した。NS2 結合宿主因子を MALDI-TOF/MS により同定したところ、 $\gamma$ -tubulin および ANT ( Adenine Nucleotide Translocase ) 2/3 であった。ANT2/3 はミトコンドリア蛋白質である事から、さらに NS2 蛋白質のミトコンドリアへの局在を調べ、NS2 発現細胞においてミトコンドリア中に NS2 蛋白が局在している事を確認した。

[ 鈴木亮介、松田麻未、鈴木哲朗、宮村達男 ]

(24) HCV 遺伝子型 1b 及び 2a genomic RNA の発現に伴う細胞蛋白質の量的変動の解析

HCV 複製が宿主細胞へ及ぼす影響を調べる為に、HCV 遺伝子型 1b 及び 2a の full-genomic RNA をそれぞれ発現している Huh7 細胞と発現していないコントロー

ル細胞について蛍光標識二次元ディファレンスゲル電気泳動解析を行い、コントロール細胞に対して差の見られるスポットを探した。各細胞検体より約 1000 spot 検出し、t-test<0.05、コントロール細胞に対して±1.5 倍以上の差の見られたスポットが、遺伝子型 1b については 11 種類、2a に関しては 3 種類存在する事がわかった。これらについて現在蛋白同定中である。

[ 松田麻未、鈴木哲朗、宮村達男 ]

#### (25) Human ICAD の遺伝子発現調節機構の解析

Inhibitor of caspase-activated DNase (ICAD)はアポトーシスを抑制的に調節する因子であるが、遺伝子発現機構は十分に明らかではない。human ICAD 遺伝子をクローニングし、転写調節機構を解析した。5' RACE 解析から翻訳コドンの上流 71 bp に転写開始点を同定し、部分欠損変異体を用いたレポーターアッセイにより転写調節に重要な領域を同定した。また、クロマチン免疫沈降法などによって、その領域内に存在する E-box 配列への転写因子 Myc の結合が human ICAD 遺伝子発現の調節に重要であることが明らかとなった。

[ 小俣和彦、鈴木亮介、政木隆博、\*佐藤田鶴子、鈴木哲朗、宮村達男 (\*日本歯科大学) ]

#### (26) HCV コア蛋白による human ICAD の遺伝子発現活性化

我々はこれまでに cDNA マイクロアレイ解析などから HCV コア蛋白発現細胞で ICAD の発現が上昇することを見出している。そこで、HCV コア蛋白が human ICAD プロモーター活性へ及ぼす影響を解析した。human ICAD プロモーター活性は HCV コア蛋白の発現によって亢進されること、全長コア蛋白に比べ C 末端側を部分欠損させた核局在型の方がその効果が大きいことがわかった。

[ 小俣和彦、鈴木亮介、\*佐藤田鶴子、鈴木哲朗、宮村達男 (\*日本歯科大学) ]

#### (27) ヒト B 細胞株を用いた HCV 病原性機構の解析

HCV 感染による肝外病変、特に B 細胞系へ及ぼす影響を明らかにするため、HCV コア蛋白発現 B 細胞株 (Bjab Core) と一過性にコア蛋白を発現させた EBV

B cell line (EB-BCL Core)を使って HCV コア蛋白の発現に伴う B 細胞表面分子変化を検索した。CD48 抗原の発現低下が最も顕著であること、コア蛋白の発現によって、CD48 のプロモーター活性及び mRNA レベルが低下することを見出した。さらに、コア蛋白の発現量依存的な CD48 プロモーター活性の抑制効果を明らかにした。[ 町田早苗、鈴木亮介、小俣和彦、石井孝司、鈴木哲朗、宮村達男 ]

#### (28) シグナルペプチド付加 HCV E2 蛋白による細胞性免疫誘導の試み

HCV に対する DNA ワクチンは作製が簡便などのメリットがあるもの細胞性免疫 (CTL) の誘導効率が低い。我々は、配列多様性に富んだ HCV E2 領域に対する CTL を効率よく誘導するため、シグナルペプチドを付加させた形で E2 蛋白を発現させ本来の蛋白プロセッシングを保持させることを試みた。E1 の C 末端側疎水性領域に存在する E2 シグナルペプチドを付加した E2、及び単独 E2 の発現プラスミドを作製し、マウスに免疫し、CTL 活性を解析した。その結果、シグナルペプチド付加 E2 を免疫したマウスで有意に CTL が誘導され、新しいドミナントエピトープが見出された。

[ 町田早苗、石井孝司、鈴木亮介、\*赤塚俊隆、鈴木哲朗、宮村達男 (\*埼玉医科大学) ]

#### (29) C 型肝炎治療薬に対する耐性ウイルスの解析

現在、C 型肝炎に対する治療法として最も効果が期待できるのは、IFN とリバビリンの併用療法であるが、リバビリンに対する耐性ウイルスの出現については不明な点が多い。そこで、遺伝子型 1b 及び 2a の HCV レプリコン細胞にリバビリンを数ヶ月間処理したところ、遺伝子型 2a レプリコン細胞がリバビリン耐性を獲得することを見出し、耐性細胞で特徴的な HCV 遺伝子変異を同定した。

[ スス・ムエー、\*脇田隆宇、\*\*小池和彦、鈴木哲朗、宮村達男 (\*都神経研、\*\*東京大学) ]

#### (30) HCV RNA 結合ペプチドの探索

抗 HCV 薬の創製を目指して、HCV RNA に特異的に結合しウイルス増殖を阻害するペプチドの探索を行って

## ウイルス第二部

いる。RNA 結合ペプチドのスクリーニングには、ユニークな細胞内 RNA-ポリペプチド相互作用検出系である KAN (Kanamycin Antitermination) システムを用いた。KAN システムでは、標的 HCV RNA 発現プラスミドとランダムペプチドライブラリー発現ベクターを大腸菌内で共発現させ、レポーターアッセイによって結合ペプチド配列を選択する。これまでに HCV 5' 非翻訳領域 RNA と結合しうる 3 個の陽性クローンを得た。

[ 鎌田麻利江、石井孝司、\*原田和雄、鈴木哲朗、宮村達男 (\*東京学芸大学) ]

### (31) C 型肝炎の発症進展に關与する宿主遺伝子の解析

ウイルス肝炎の個別診断、治療法への応用を最終的な目標として、C 型肝炎の発症、進展に關連する遺伝子多型の解析を行っている。日本人健常者及び C 型肝炎患者についてアレル特異的 SNP 検出プローブを用いて X、Y を除く全染色体にわたって SNP スキャンニングを行った。その結果、C 型肝炎の発症と最も強く連鎖する領域が 7 番染色体内に見出された。現在、標的領域の絞り込みと候補遺伝子の同定を進行中である。

[ 鈴木哲朗、\*亀岡洋祐、吉崎佐矢香、宮村達男 (\*医薬基盤研) ]

### (32) 歯科診療における院内感染対策ガイドライン作成へ向けた情報収集

近年、歯科医療における診療技術の高度化、多様化に伴って院内感染対策を組織的、体系的に整備することが求められている。厚生労働省研究班にてウイルス性肝炎、エイズなどの感染リスク評価に立脚したガイドラインの作成を進めている。CDC ガイドラインの翻訳本の作成を分担するとともに、コクランライブラリーを利用した感染リスク情報の網羅的な収集を行った。

[ 鈴木哲朗、\*佐藤田鶴子、宮村達男 (\*日本歯科大学) ]

### (33) HCV NS5A 蛋白質と amphiphysin II の相互作用

HCV の NS5A 蛋白質は細胞内で小胞状膜構造を形成し、その膜上に局在する。Amphiphysin II は脂質二重膜の湾曲度センサーとして機能する蛋白質で、エンドサイトーシスでの小胞形成に關与する。したがって、

NS5A 蛋白質は amphiphysin II と結合することにより、その機能を利用して小胞状膜構造を形成すると予想された。しかし、NS5A 蛋白質の局在する小胞状膜構造の形成には、amphiphysin II は關与していないことを明らかにした。

[ 西村順裕、岡本徹 (阪大微研)、森石恆司 (阪大微研)、松浦善治 (阪大微研) ]

### (34) HCV コア蛋白と結合する宿主因子の検索

HCV コア蛋白質の新たな機能を同定する目的で、MEF-tag 精製法、および GST-pull down 法を用いてコア蛋白に特異的に結合する宿主因子のスクリーニングをおこなった。特異的な結合蛋白を SDS-PAGE ゲルより回収し、質量分析法で分析し、7 つの新規結合因子を得た。これらとコア蛋白の結合を免疫沈降法で確認した。HCV による病原性、ウイルス複製との關連について解析している。

[ 勝二郁夫、白倉雅之、下地 徹、福田浩一郎、村上恭子、鈴木亮介、鈴木哲朗、宮村達男; 市村徹 (都立大)、佐藤慈子、深澤征義、山河芳夫、西島正弘 (細胞化学)、水本清久 (北里大薬) ]

### (35) E6AP による HCV コア蛋白の分解調節機構の解析

コア蛋白の新規結合因子として E3 ユビキチンリガーゼ E6-associated protein (E6AP) を同定した。E6AP 依存性コア蛋白分解の分子機構について解析した。E6AP (WT) との共発現では、Core 蛋白のユビキチン化が促進され、E6AP (dn) との共発現では、ユビキチン化は抑制された。また、siRNA で E6AP の発現を抑制したところ Core 蛋白の分解が阻害された。コア蛋白の E3 ユビキチンリガーゼが E6AP であることを明らかにした。

[ 白倉雅之、勝二郁夫、下地徹、福田浩一郎、村上恭子、鈴木亮介、鈴木哲朗、宮村達男; 市村徹 (都立大) ]

### (36) HCV コア蛋白と E6AP の結合領域の解析

E6AP によるコア蛋白の認識機構を明らかにするために、コア蛋白および E6AP の各種欠損変異体を発現するプラスミドを作製した。これらを用いて GST-pull down



## ウイルス第二部

法、免疫沈降法などで結合部位を解析した。E6AP との結合にはコア蛋白の N 末側に重要な領域が存在することが分かった。また、E6AP 側は HECT domain 近傍に重要な領域が存在することが明らかとなった。更に詳細に結合部位を解析中である。

[福田浩一郎、勝二郁夫、白倉雅之、下地徹、村上恭子、鈴木亮介、鈴木哲朗、宮村達男；水本清久（北里大薬）]

(37) HCV コア蛋白と結合する宿主因子 ftp-3 の解析  
コア蛋白と結合する宿主因子として ftp-3 を同定した。ftp-3 は主として核内に存在する RNA 結合蛋白で RNA スプライシングに関与すると推定されている。細胞内での結合は免疫沈降法ーイムノプロット法で確認することができた。コア蛋白との結合が ftp-3 の機能に及ぼす影響と病原性との関連を解析している。

[勝二郁夫、村上恭子、下地 徹、福田浩一郎、宮村達男、市村 徹（都立大学）]

### (38) HCV 非構造蛋白と結合する宿主因子の解析

HCV がコードする非構造領域蛋白は酵素活性を有し、ウイルス複製に必須である。ウイルスが複製する際には宿主の複製機構を巧みに利用していると推定されるが、どの宿主因子を利用しているかは明らかになっていない。そこで、MEF-tag affinity 精製法と質量分析法で HCV 非構造蛋白と結合する宿主因子のスクリーニングを行い、ウイルス複製を規定する宿主側因子の同定を試みている。  
[勝二郁夫、白倉雅之、村上恭子、下地 徹、福田浩一郎、宮村達男、市村徹（都立大）、水本清久（北里大薬）]

### (39) HCV IRES IIIId 領域に結合する宿主因子の影響

HCV 5' 非構造領域内の IIIId 領域にはコア蛋白が結合すること、及びコア蛋白が HCV IRES 依存的翻訳を抑制する事が報告されている。翻訳抑制の機構として IIIId に結合する宿主因子とコアの拮抗作用が考えられた。そこで、IIIId 領域特異的に結合する宿主因子を検索したところ、p54-nrb, hnRNP-H, PSF 等が同定された。これらの因子と HCV-RNA 複製効率、粒子形成等への影響を検討中である。

[村上恭子、福田浩一郎、下池貴志、松田麻未、勝二郁

夫、鈴木哲朗、宮村達男]

### (40) HCV コア蛋白質による HCV RNA の翻訳抑制機構の解析

これまで HCV 5' 非翻訳領域(5' UTR)内の stem-loop IIIId 領域 (IIIId)に HCV コア蛋白質が相互作用し 5' UTR 依存的翻訳を抑制することを示唆する結果を得た。昨年に引き続き、翻訳抑制に重要なコア蛋白質領域を更に詳しく調べた結果、コア蛋白質に存在する正に荷電したアミノ酸残基のクラスター、三領域が翻訳抑制に重要であることを示唆する結果を得た。翻訳に重要な宿主因子と HCV 5' UTR との相互作用にコア蛋白質がどのように関わるかの解析を進めている。

[下池貴志、鈴木哲朗、\*松浦善治、宮村達男：（\*阪大微研）]

## 3. E 型肝炎ウイルス (HEV) に関する研究

### (1) 遺伝子 1 型 (G1)、G3 及び G4 HEV VLP の抗原性の比較

組換えバキュロウイルス発現システムを用い、G1、G3 及び G4 HEV の ORF2 の N 末端から 111 アミノ酸を欠失した領域を昆虫細胞で発現させ、VLP の作製に成功した。G1 と G3 の VLP をマウスに免疫し、単クローン抗体を作製した。エピトープが同定されたそれぞれの単クローン抗体を用い、G1、G3 型及び G4 VLP との反応の違いから抗原性を評価した。その結果、遺伝子型間には抗原性の異なるエピトープが存在し、一部のエピトープは立体構造に依存する事が明らかになった。また、遺伝子型特異的な単クローン抗体が得られた。これらの単クローン抗体を用いて、遺伝子型を識別できる抗原および抗体検出法の樹立を進めている。

[李 天成、武田直和、宮村達男]

### (2) E 型肝炎ウイルス中空粒子 (HEV VLP) 形成に必須な領域の同定

N 末端から 111 アミノ酸を欠失させた HEV 構造蛋白を組換えバキュロウイルスで発現すると、直径約 23-24nm の VLP が産生される。アミノ酸配列解析によって、この粒子蛋白は 497 個のアミノ酸から形成され、N 末端の 111 個のアミノ酸以外に C 末端から 52 個のア

## ウイルス第二部

ミノ酸が欠失していることが明らかになっている。構造蛋白の N 末端、あるいは C 末端、さらに両端を欠失した構造蛋白を発現し、VLP 形成に必須な領域の同定を試みた結果、VLP 形成に必須な領域は 126-601 アミノ酸であることが明らかになった。

[ 李 天成、武田直和、宮村達男 ]

### ( 3 ) 大きなサイズをもつ G3 HEV VLP の作製およびウイルス遺伝子との結合

G3 HEV の ORF2 全長を発現し、直径約 35-38nm の粒子を作製することに成功した。この粒子は形状、サイズともネイティブなウイルス粒子と非常に類似の粒子であった。現在、クリオ電顕で三次構造の解析をおこなっている。また、この粒子の中には約 2k bp の ORF2 RNA が取り込まれていた。HEV 全長遺伝子を含む組み換えバキュロウイルスと ORF2 全長の組み換えバキュロウイルスを共感染し、HEV 全長遺伝子を大きい粒子に取り込めるかどうかを検討している。

[ 李 天成、恒光 裕 ( 動衛研 ) 武田直和、宮村達男 ]

### ( 4 ) G4 HEV の構造蛋白の発現及び抗原性の解析

イノシシからヒトの HEV と極めて類似の HEV が分離されている。イノシシの HEV 抗体保有率は高く、中間宿主の一つではないかと考えられている。急性 E 型肝炎患者血清から 2 株、イノシシ糞便から 1 株の G4 HEV 遺伝子を検出した。構造蛋白全長、及び N 末端から 13 アミノ酸を欠失した領域を RT-PCR 法で増幅し、定法どおり組換えバキュロウイルスを作製し、VLP 形成を電子顕微鏡で観察した。しかし、いまだウイルス様粒子形成は見られていない。さらに改変したコンストラクトを作製し、大きな VLP の作製を進めている。

[ 本郷美那子、李 天成、宮村達男、武田直和、栄 賢司、伊藤 雅 ( 愛知衛研 ) ]

### ( 5 ) マングースの E 型肝炎ウイルス抗体保有状況

HEV の中間宿主を同定する目的で、沖縄島の野生マングース 84 匹を捕獲し、血清抗体および HEV 遺伝子の保有状況を調べた。組換え HEV 様中空粒子をマイクロプレートに固相化し、酵素標識抗ネコ IgG および IgM を二次抗体とした ELISA 法を確立した。抗体の有無は

ウエスタン法 ( WB ) で確認した。また、血清から RNA を抽出し、RT-PCR 法によって構造蛋白領域の一部を増幅した。この結果、7 匹 ( 8.3% ) が IgG 抗体陽性で、12,800 倍の抗体価を有する個体があった。この個体は IgM 抗体も陽性であった。IgG 抗体保有率は体重、身長とともに増加する傾向が見られた。HEV 遺伝子の増幅は成功していない。

[ 李 天成、宮村達男 武田直和、斉藤美加、小倉 剛 ( 琉球大学 ) ]

### ( 6 ) HEV の異種動物への感染実験

最近の遺伝子解析の結果から、野生動物由来 HEV はヒト由来 HEV と極めて似ている事が明らかになってきた。HEV が種の壁を越えて異種動物に感染するかどうかを明らかにするため、イノシシ由来の G4 HEV およびブタ由来の G3 HEV をそれぞれカニクイザルに静脈注射し、経時的に採血、採便し、血中の ALT、AST、HEV RNA、IgG、IgM、IgA および便中の HEV RNA を測定した。何れのサルも ALT、AST、IgG、IgM、IgA の上昇と、便、血中からの HEV RNA の検出が確認され、野生動物由来 HEV はサルに感染することが明らかになった。

[ 李 天成、武田直和、宮村達男、網 康至、須崎百合子 ( 動物管理室 ) ]

### ( 7 ) 野生動物の HEV 感染状況調査

イノシシ、シカ、野ウサギの HEV 感染状況を知る目的で、血清から HEV RNA 検出および HEV-IgG 抗体調査を行った。シカでは 287 検体の全てが HEV RNA、および HEV-IgG 抗体陰性であった。野ウサギの血清 31 検体からも抗体は検出されなかった。イノシシ血清 169 検体では 84 検体 ( 49.7% ) が陽性であった。さらに調査する必要があると考えている。

[ 李 天成、武田直和、宮村達男、棚林 清、山田章雄 ( 獣医科学部 ) ]

### ( 8 ) 輸血後肝炎における E 型肝炎ウイルス ( HEV ) の臨床的意義

輸血後肝炎の疑われる症例検体について抗 HEV 抗体保有率の解析を行った。測定した 91 症例全例で抗 IgM

## ウイルス第二部

抗体は陰性であった。抗 IgG 抗体は 17 例 (18.7%) が陽性であった。また、供血者血清 500 検体について同様に抗 HEV 抗体の解析を行ったところ、抗 IgG 抗体は 16 例 (3.2%)、抗 IgM 抗体は 0 例 (0%) が陽性であった。輸血歴を有する患者群では、輸血を介した抗 HEV 抗体の伝搬などのために抗 IgG 抗体保有率が高い傾向にあるのかもしれない。

[ 李 天成、\*菊地 秀、\*\*瀧本 眞、\*\*\*藤井寿一、\*\*\*\*枝元良弘、鈴木亮介、武田直和、鈴木哲朗、宮村達男 ]  
( \*仙台医療センター、\*\*兵庫県リハビリテーションセンター附属中央病院、\*\*\*東京女子医科大学、\*\*\*\*国立国際医療センター )]

### 4. GB ウイルス (GBV) に関する研究

#### (1) GBV-B 感染動物モデルの確立

GBV-B の全長 cDNA から合成した GBV-B RNA をタマリンの肝臓に接種することで急性肝炎を発症させられることを昨年報告したが、より簡便な感染モデル構築のため本年はマーモセットに GBV-B RNA またはタマリンの感染血漿を接種することでウイルス血症を発症させられるかを検討した。マーモセットは RNA、感染血漿いずれの接種でもウイルス血症は発症したが、急性肝炎症状は呈さなかった。

[ 石井孝司、吉崎佐矢香、鈴木哲朗、宮村達男、\*飯島沙幸、\*明里宏文、\*\*山口健次郎、\*\*榎 昇 ( \*医薬基盤研、\*\*先端生命科学研 )]

#### (2) GBV-B 蛋白を発現する組み換え DIIs による免疫誘導能の検討

GBV-B の構造蛋白や非構造蛋白の一部を組み込んだ組み換え DIIs を作成し、マウスに皮下接種したところ、目的蛋白質に対する抗体の誘導が認められた。現在、これらの DIIs をタマリンあるいはマーモセットに接種し、GBV-B を感染させて防御効果を検討する実験を進めている。

[ 石井孝司、吉崎佐矢香、鈴木哲朗、宮村達男、\*飯島沙幸、\*明里宏文、\*\*山口健次郎、\*\*榎 昇 ( \*医薬基盤研、\*\*先端生命科学研 )]

## IV. 腫瘍ウイルスに関する研究

### 1. ヒト乳頭腫ウイルス (HPV)に関する研究

#### (1) HPV16E6 蛋白と結合する宿主蛋白 E6AP の新規基質蛋白の検索

HPV16E6 蛋白は宿主蛋白である E6AP と複合体を形成し E3 コピキチンリガーゼとして機能し、p53 をコピキチン化し、分解され、不活化する。E6AP は単独でもコピキチンリガーゼ活性を有する。E6AP の新規基質蛋白を同定するために、MEF-tag 精製法、質量分析法を用いて解析し、新規 E6AP 結合蛋白を同定した。得られた結合蛋白は新規基質蛋白の可能性が考えられ、現在、詳細に検討中である。

[ 勝二郁夫、下地徹、宮村達男；市村 徹 ( 都立大 )]

#### (2) E6AP と annexin A1 の相互作用と機能解析

子宮頸癌細胞株 C33A 細胞から GST-pull down 法により E6AP 新規結合蛋白として annexin A1 を同定した。in vitro において E6AP は annexin A1 と Ca<sup>2+</sup>依存性に結合した。また、E6AP と annexin A1 を共発現させたところ、annexin A1 の蛋白レベルが減少したことから、annexin A1 は E6AP のコピキチン化の基質である可能性が示唆された。現在、E6AP 依存性 annexin A1 分解機構について解析を進めている。

[ 下地徹、勝二郁夫、松田麻未、村上恭子、宮村達男 ]

## V. SARS コロナウイルス (SARS-CoV) に関する研究

#### (1) SARS コロナウイルス (SARS-CoV) 構造蛋白のワクチニアウイルスでの発現

重症急性呼吸器症候群 (SARS) は SARS-CoV 感染によって起こる疾患で、症状の重篤さと致死率の高さから人類に対する深刻な新たな脅威となっている。本疾患の高感度診断系およびワクチン開発を目的として、SARS-CoV の構造蛋白 4 種の cDNA を DIIs 株に組み込み、組み換えウイルスを哺乳類細胞に感染させたところ、目的の各蛋白が感染細胞で発現していることが確認でき、すべての蛋白を発現させた哺乳類細胞では virus-like particle (VLP) が形成されていることが示唆された。この VLP は診断薬やワクチンの候補として重要であると考えられ、現在研究を進めている。

[ 石井孝司、鈴木哲朗、宮村達男、\*横田恭子、\*\*長谷川秀樹、\*\*永田典代、\*\*\*水谷哲也、\*\*\*森川 茂、\*\*\*\*田

## ウイルス第二部

口文広、\*\*\*\*田代真人 (\*免疫部、\*\*感染病理部、\*\*\*ウイルス第一部、\*\*\*\*ウイルス第三部)]

(2) SARS-CoV 構造蛋白を発現する組換えワクチニアウイルスの免疫誘導能の検討

SARS-CoV 構造蛋白を発現する組換え DIIs をマウスに皮下及び経鼻接種したところ、いずれのマウスでも SARS-CoV に対する液性及び細胞性免疫が誘導された。Spike protein である S を発現する組換え DIIs を接種された群では、SARS-CoV を経鼻接種した場合に感染から完全に防御されたことから、本組換え DIIs は SARS ワクチンの候補として有望であると考えられる。

[石井孝司、鈴木哲朗、宮村達男、\*横田恭子、\*大西和夫、\*高須賀直美、\*\*長谷川秀樹、\*\*永田典代、\*\*\*水谷哲也、\*\*\*森川 茂、\*\*\*\*田口文広、\*\*\*\*田代真人 (\*免疫部、\*\*感染病理部、\*\*\*ウイルス第一部、\*\*\*\*ウイルス第三部)]

(3) コロナウイルスの生活環における lipid raft の役割

マウス肝炎ウイルス (MHV) は HCV と同じプラス鎖 RNA ウイルスであるが、HCV と異なり、効率の良い細胞培養系が確立している。そこでまず、MHV の生活環における lipid raft の役割について調べた。その結果、lipid raft は MHV のエントリーや細胞融合には必要だが、ウイルス放出には必要ないことがわかった。今後、この実験に用いた方法を用いて、HCV の生活環における lipid raft の役割について研究する予定である。

[相崎英樹、\*マイケル・ライ (\*南カルフォルニア大学)]

## VI. その他の研究

(1) ナノバイオ構造用高速高精度解析用電子顕微鏡 (TEM) の改良研究

最近の BSE や炭疽菌テロに代表されるように、各種感染症の増大が顕在化している。感染症原因であるウイルスやプリオン蛋白質の機能を解明するためにナノオーダーの微細構造解析が極めて重要で、数百 nm サイズの微小かつ微量なウイルスやプリオン蛋白質の微細構造を直接観察するには高分解能電子顕微鏡 (TEM) が唯一のツールである。高コントラスト像検出系技術、ウイルス・

蛋白質サーチ画像処理技術、試料前処理用マイクロマシン技術を開発し、これらを搭載したナノバイオ構造高速高精度解析用電子顕微鏡を企画開発したが、これを現在改良検討中である。

[宇田川悦子、柿林博司 (日立中央研究所)]

(2) サブトラクション法による輸血後肝炎原因因子の探索

既知の肝炎ウイルス、TTV が関与しない輸血後肝炎症例の血漿検体からサブトラクション法により病因因子の探索を行った。輸血後検体から特異的に増幅される遺伝子断片に候補クローンを得ており、現在、cDNA クローニングのためライブラリースクリーニングを行っている。

[スス・ムエー、鈴木亮介、\*瀧本 眞、\*\*小池和彦、鈴木哲朗、宮村達男 (\*兵庫県リハビリテーションセンター附属中央病院、\*\*東京大学)]

(3) HRV に関する臨床研究および HRV RNA 定量法の開発

慢性呼吸器疾患の急性増悪は、しばしば感冒が契機となって起こると考えられている。感冒の原因として、ウイルス感染が、なかでも HRV 感染の頻度が高いと考えられている。そこで気管支喘息および慢性閉塞性肺疾患患者急性増悪時の HRV 感染の寄与について前向き多施設研究で検討を行っている。現在までに、59 例を登録し、2 例の急性増悪を確認した。現在、TaqMan Real-Time PCR 法による virus RNA 定量法の確立を試みている。これまでに、 $10^3$  copy/Sample までの定量が可能となった。

[沼田尊功、井上 寧、佐藤哲夫\*、鈴木哲朗、宮村達男 (\*東京慈恵会医科大学呼吸器内科)]

(4) TGP 三次元培養肝細胞のプロテオーム解析

TGP 中でスフェロイド状に三次元培養されたヒト肝癌細胞では細胞極性が形成される。この時どのような蛋白の発現が変化しているかを明らかにするためプロテオーム解析を行った。その結果、単層培養系に比べ脂肪酸輸送に関わる fatty acid binding protein (FABP) 1 の発現上昇が Huh7、HepG2 細胞ともに認められた。この時、FABP1 mRNA レベルも上昇していること、また FABP

## ウイルス第二部

の転写活性化に関わる peroxisome proliferator-activated receptor の遺伝子発現が亢進していることを定量 RT-PCR 法で明らかにした。

[吉崎佐矢香、松田麻未、石井孝司、鈴木哲朗、宮村達男]

### (5) TGP 三次元培養における肝機能発現

分化型ヒト肝癌細胞株の TGP 三次元培養系が、単層培養系に比べ肝機能発現がどのように異なるかをアルブミン産生能を指標として解析した。HepG2 細胞を TGP で培養した場合、単層培養に比べ細胞外に分泌されるアルブミン量の有意な上昇が観察された。この時、アルブミンの mRNA 量は三次元培養系の方がやや高い傾向にあったものの有意差は認められず、遺伝子発現から蛋白分泌に至るまでの複数過程における分子機構が関与し、最終的な steady-state level の差に繋がっていると考えられた。

[岩田耕一郎、吉崎佐矢香、\*岩堀 徹、\*\*平野俊彦、鈴木哲朗、宮村達男(\*東京医科大学、\*\*東京薬科大学)]

### (6) TGP 三次元培養肝細胞のマイクロアレイ解析

HepG2 細胞の TGP 三次元培養系での遺伝子発現変化をマイクロアレイ法によって網羅的に解析した。TGP 培養によって発現量が 2 倍以上に増加した遺伝子は 87 種類、2 分の 1 以下に低下した遺伝子は 20 種類だった。細胞増殖、細胞周期に関与する遺伝子の発現減少、細胞骨格、脂質代謝に関連する遺伝子の発現増加が特徴的であった。

[岩田耕一郎、吉崎佐矢香、\*岩堀 徹、\*\*平野俊彦、鈴木哲朗、宮村達男(\*東京医科大学、\*\*東京薬科大学)]

### (7) 足場付加型新規 TGP による高分化型肝癌細胞 FLC4 の培養

細胞接着因子を付加した TGP を用いて FLC4 細胞の三次元培養を試みた。細胞接着因子(水溶性ゼラチン、コラーゲンペプチド、ゼラチン)含量、付加方法、基材を変えて検討を行った。転移温度が 20 以上のゲル、接着因子を点在させたゲルでは増殖は認められなかった。一方、転移温度が 15 のゲル、接着因子を均一に付加したゲルでは増殖とスフェロイド形成が認められた。スフ

ェロイド形成が良好であったコラーゲンペプチド 8%含有ゲルでは培養上清中へのアルブミン、フェトプロテインの分泌上昇が認められた。

[吉崎佐矢香、松田麻未、石井孝司、鈴木哲朗、宮村達男]

### (8) 高機能保持性肝癌細胞株を用いたレチノイン酸によるアルブミン発現調節機構の解析

All-trans retinoic acid (ATRA)がアルブミン産生を転写レベルで低下させることを見出した。この調節にはアルブミン遺伝子の nt 367/-167 領域が重要であること、ATRA により C/EBP の dominant-negative isoform である liver-enriched transcriptional inhibitory protein (LIP)の発現が選択的に上昇すること、LIP の過剰発現は C/EBP によるアルブミンの転写活性化作用を抑制することを見出した。以上より、ATRA によるアルブミンの発現低下には LIP の dominant negative 作用が重要であることが分かった。

[政木隆博、鈴木哲朗、\*松浦知和、\*\*岡崎 勲、宮村達男(\*東京慈恵会医科大学・臨床検査医学、\*\*東海大学医学部公衆衛生・社会医学)]

## <別> 検査業務

### 第1室:

#### 行政検査

ノロウイルス確認検査 5件、61検体

E型肝炎確認検査 8件、60検体

#### 検定業務

経口生ポリオワクチン 小分製品 1件

### 第2室:

#### 行政検査

平成 16 年度は 4 株のポリオウイルス分離株について行政検査依頼があり、PCR-RFLP 法あるいは ELISA 法による型内株鑑別試験の結果、すべてワクチン株と同定された。富山県で分離された 2 型ポリオウイルスは、塩基配列解析の結果 VDPV と判別された。未同定エンテロウイルス計 13 株の同定について行政検査依頼があり、塩基配列解析による同定を行った。

## ウイルス第二部

第3室及び第4室：

依頼試験

B型肝炎ウイルス体外診断薬 2件

C型肝炎ウイルス体外診断薬 1件

第5室：

検定業務

乾燥組織培養不活化A型肝炎ワクチン 2件

組換え沈降B型肝炎ワクチン(酵母由来) 2件

沈降B型肝炎ワクチン(huGK-14細胞由来) 5件

## 発表業績一覧

### I. 誌上発表

#### 1. 欧文発表

1) Tamura M, Natori K, Kobayashi M, Miyamura T, Takeda N: Genogroup II noroviruses efficiently bind to heparan sulfate proteoglycan associated with cellular membrane. *J. Virol.* 78: 3871-3826, 2004.

2) Okamoto K, Moriishi K, Miyamura T, Matsuura Y: Intramembrane proteolysis and endoplasmic reticulum retention of hepatitis C virus core protein. *J. Virol.* 78: 6370-6380, 2004.

3) Guntapong R, Hansman GS, Oka T, Ogawa S, Kageyama T, Pongsuwanna Y, Katayama K: Norovirus and sapovirus infections in Thailand. *Jpn. J. Infect. Dis.* 57: 276-278, 2004.

4) Katayama K, Miyoshi T, Uchino K, Oka T, Tanaka T, Takeda N, Hansman GS: Novel recombinant sapovirus. *Emerg. Infect. Dis.* 10: 1874-1876, 2004.

5) Hansman GS, Doan L, K Nguyen T, Okitsu S, Katayama K, Ogawa S, Natori K, Takeda N, Kato Y, Nishio O, Abe K, Ushijima H: Detection of norovirus and sapovirus infection among children with gastroenteritis in Ho Chi Minh City, Vietnam. *Arch. Virol.* 149: 1673-1688, 2004.

6) Hansman GS, Katayama K, Maneekarn N, Peerakome S, Khamrin P, Tonusin S, Okitsu S, Nishio O, Takeda N, Ushijima H: Genetic diversity of norovirus and sapovirus in hospitalized infants with sporadic cases of acute gastroenteritis in Chiang Mai, Thailand. *J. Clin. Microbiol.* 42: 1305-1307, 2004.

7) Matsubayashi K, Nagaoka Y, Sakata H, Sato S, Fukai K,

Kato T, Takahashi K, Mishiro S, Imai M, Takeda N, Ikeda H: Transfusion-transmitted hepatitis E caused by apparently indigenous hepatitis E virus strain in Hokkaido, Japan. *Transfusion* 44: 934-940, 2004.

8) Tajiri-Utagawa. E: Small round structured viruses (SRSVs) and transmission electron microscopy (TEM). *African J. Biotech.* 3 : 8-11, 2004.

9) Shimizu H, Utama A, Onnimala N, Li C, Li-Bi Z, Yu-Jie M, Pongsuwanna Y, Miyamura T: Molecular epidemiology of enterovirus 71 infection in the Western Pacific Region. *Pediatr. Int.* 46: 231-235, 2004.

10) Shimizu H, Thorley B, Paladin FJ, Brussen KA, Stambos V, Yuen L, Utama A, Tano Y, Arita M, Yoshida H, Yoneyama T, Benegas A, Roesel S, Pallansch M, Kew O, Miyamura T: Circulation of type 1 vaccine-derived poliovirus in the Philippines in 2001. *J. Virol.* 78: 13512-13521, 2004.

11) Nagata N, Iwasaki T, Ami Y, Tano Y, Harashima A, Suzaki Y, Sato Y, Hasegawa H, Sata T, Miyamura T, Shimizu H: Differential localization of neurons susceptible to enterovirus 71 and poliovirus type 1 in the central nervous system of cynomolgus monkeys after intravenous inoculation. *J. Gen. Virol.* 85: 2981-2989, 2004.

12) Arita M, Shimizu H, Miyamura T: Characterization of in vitro and in vivo phenotypes of poliovirus type 1 mutants with reduced viral protein synthesis activity. *J. Gen. Virol.* 85: 1933-1944, 2004.

13) Kew OM, Wright PF, Agol VI, Delpeyroux F, Shimizu H, Nathanson N, Pallansch MA: Circulating vaccine-derived polioviruses: current state of knowledge. *Bull. World Health Organ.* 82: 16-23, 2004.

14) Nishimura Y, Shimojima M, Sato E, Izumiya Y, Tohya Y, Mikami T, Miyazawa T: Downmodulation of CD3ε expression in CD8α+β- T cells of feline immunodeficiency virus-infected cats. *J. Gen. Virol.* 85: 2585-2589, 2004.

15) Ichimura N, Shimojima M, Nishimura Y, Tohya Y, Akashi H: Molecular cloning and sequencing of feline CD7. *J. Vet. Med. Sci.* 66: 1255-1258, 2004.

16) Suzuki T, Suzuki R, Li J, Hijikata M, Matsuda M, Li TC, Matsuura Y, Mishiro S, Miyamura T: Identification of basal promoter and enhancer elements in an untranslated region of

## ウイルス第二部

- the TT virus genome. *J. Virol.* 78: 10820-10824, 2004.
- 17) Aizaki H, Lee KJ, Sung VM, Ishiko H, Lai MM: Characterization of the hepatitis C virus RNA replication complex associated with lipid rafts. *Virology* 324: 450-61, 2004.
- 18) Gao L, Aizaki H, He JW, Lai MM: Interactions between viral nonstructural proteins and host protein hVAP-33 mediate the formation of hepatitis C virus RNA replication complex on lipid raft. *J. Virol.* 78: 3480-3488, 2004.
- 19) Matsukura T, Sugase S: Human papillomavirus genomes in squamous cell carcinomas of the uterine cervix. *Virology* 439-449, 2004.
- 20) Suzuki R, Sakamoto S, Tsutsumi T, Rikimaru A, Tanaka K, Shimoike T, Moriishi K, Iwasaki T, Mizumoto K, Matsuura Y, Miyamura T, Suzuki T: Molecular determinants for subcellular localization of hepatitis C virus core protein. *J. Virol.* 79: 1271-1281, 2005.
- 21) Maloney BJ, Takeda N, Suzaki Y, Ami Y, Li TC, Miyamura T, Arntzen CJ, Mason HS: Challenges in creating a vaccine to prevent hepatitis E. *Vaccine* 23: 1870-1874, 2005.
- 22) Kamata K, Shinozaki K, Okada M, Seto Y, Natori K, Shirato-Horikoshi H, Katayama K, Takeda N, Tanaka T, Taniguchi K: Molecular cloning, expression and antigenicity of norovirus virus-like particles and detection of noroviruses in stool samples. *J. Med. Virol.* 76: 129-136, 2005.
- 23) Hansman GS, Natori K, Ushijima H, Katayama K, Takeda N: Characterization of polyclonal antibodies raised against sapovirus genogroup five virus-like particles. *Arch. Virol.* DOI: 10.1007/s00705-005-0506-0, 2005.
- 24) Hansman GS, Katayama K, Oka T, Natori K, Takeda N: Mutational study of sapovirus expression in insect cells. *Virol. J.* 2: 13, 2005.
- 25) Oka T, Katayama K, Ogawa S, Hansman GS, Kageyama T, Ushijima H, Miyamura T, Takeda N: Proteolytic processing of sapovirus ORF1 polyprotein. *J. Virol.* 79: 7283-7290, 2005.
- 26) Hansman GS, Natori K, Oka T, Ogawa S, Tanaka K, Nagata N, Ushijima H, Takeda N, Katayama K: Cross-reactivity among sapovirus recombinant capsid proteins. *Arch. Virol.* 150: 21-36, 2005.
- 27) Hansman GS, Kuramitsu M, Yoshida H, Katayama K, Takeda N, Ushijima H, Surenkhand G, Gantulga D, Kuroiwa C: Viral gastroenteritis in Mongolian infants. *Emerg. Infect. Dis.* 11: 180-182, 2005.
- 28) Bull RA, Hansman GS, Clancy LE, Tanaka MM, Rawlinson WD, White PA: Norovirus recombination in ORF1/ORF2 overlap. *Emerg. Infect. Dis.* 11: 1079-85, 2005.
- 29) Huang QS, Greening G, Baker G, Grimwood K, Hewitt J, Hulston D, van Duin L, Fitzsimons A, Garrett N, Graham D, Lennon D, Shimizu H, Miyamura T, Pallansch MA: Persistence of oral polio vaccine virus after its removal from the immunization schedule in New Zealand. *Lancet* 366: 394-396, 2005.
- 30) Arita M, Shimizu H, Nagata N, Ami Y, Suzaki Y, Sata T, Iwasaki T, Miyamura T: Temperature-sensitive mutants of enterovirus 71 show attenuation in cynomolgus monkeys. *J. Gen. Virol.* 86: 1391-1401, 2005.
- 31) Ishikawa T, Fukushima Y, Shiobara Y, Kishimoto T, Tanno S, Shoji I, Suzuki T, Matsui T, Shimada Y, Ohyama T, Nagai R, Miyamura T: Outbreak of hepatitis C virus infection in an outpatient clinic. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 20: 1087-93, 2005.
- 32) Kuramitsu M, Kuroiwa C, Yoshida H, Miyoshi M, Okurmura J, Shimizu H, Narantuya L, Bat-Ochir D: Non-polio enterovirus isolation among families in Ulaanbaatar and Tov province, Mongolia: prevalence, intrafamilial spread, and risk factors for infection. *Epidemiology and Infection* Published online 12 May 2005.
- 33) Nilsson J, Miyazaki N, Xing L, Wu B, Hammar L, Li TC, Takeda N, Miyamura T, Cheng RH: Structure and assembly of a T=1 virus-like particle in BK polyomavirus. *J. Virol.* 79: 5337-5345, 2005.
- 34) Someya Y, Takeda N, Miyamura T: Characterization of the norovirus 3C-like protease. *Virus Res.* 110: 91-97, 2005.
- 35) Tanaka E, Matsumoto A, Takeda N, Li TC, Umemura T, Yoshizawa K, Miyakawa Y, Miyamura T, Kiyosawa K: Age-specific antibody to hepatitis E virus has remained constant during the past 20 years in Japan. *J. Viral. Hepat.* 12:439-442, 2005.
- 36) Arita M, Zhu SL, Yoshida H, Yoneyama T, Miyamura T,

## ウイルス第二部

- Shimizu H: A Sabin 3-derived poliovirus recombinant contained a sequence homologous with indigenous human enterovirus species C in viral polymerase coding region. *J. Virol.* (in press).
- 37) Yang CF, Chen HY, Jorba J, Sun HC, Yang SJ, Lee HC, Huang YC, Lin TY, Chen PJ, Shimizu H, Nishimura Y, Utama A, Pallansch M, Miyamura T, Kew Oand Yang JY: Intratypic recombination among lineages of type 1 vaccine-derived poliovirus emerging during chronic infection of an immunodeficient patient. *J. Virol.* (in press).
- 38) Oka T, Katayama K, Ogawa S, Hansman GS, Kageyama K, Miyamura T, Takeda N: Cleavage activity of the Sapovirus 3C-like protease in *Escherichia coli*. *Arch. Virol.* (in press).
- 39) Li T-C, Takeda N, Miyamura T, Xing L, Wang J, Engvall H, Hammar L, Cheng RH: Essential elements of the capsid protein for self-assembly into empty virus-like particles of hepatitis E virus. *J. Virol.* (in press).
- 40) Hamamoto I, Nishimura Y, Okamoto T, Aizaki H, Liu M, Mori Y, Abe Y, Suzuki T, Lai M.M.C, Miyamura T, Moriishi K, Matsuura Y: Human VAP-B is involved in hepatitis C virus replication through interaction with NS5A and NS5B. *J. Virol.* (in press).
- 41) Oka T, Hansman G.S, Katayama K, Ogawa S, Nagata N, Miyamura T, Takeda N: Expression of sapovirus virus-like particles in mammalian cells. *Arch. Virol.* (in press).
- 42) Nakamura K, Someya Y, Kumasaka T, Ueno G, Yamamoto M, Sato T, Takeda N., Miyamura T, Tanaka N: A norovirus protease structure provides insights into active/substrate-binding site integrity. *J. Virol.* (in press).
- 43) Li T-C, Chijiwa K, Sera N, Ishibashi T, Shinohara Y, Kurata Y, Ishida M, Sakamoto S, Takeda N, Miyamura T: Transmission of hepatitis E virus from wild boar meat to a human. *Emerging Inf. Dis.* (in press).
- 44) Polyak SJ, Klein Kevin C, Shoji I, Miyamura T, Lingappa JR: Assemble and interact: pleiotropic Functions of the HCV core protein hepatitis C viruses. in *Genomes and Molecular Biology.* (Seng-Lai Tan ed.) Horizon Scientific Press, Norwich, UK, (in press).
2. 和文発表
- 1) 三好龍也, 李 天成, 武田直和, 宮村達男, 田中智之: 野生イノシシから E 型肝炎ウイルス遺伝子の検出. *肝臓.* 45: 509-510, 2004.
- 2) 李 天成, 武田直和: E 型肝炎について. *モダンメディア.* 50: 78-85, 2004.
- 3) 勝二郁夫: C 型肝炎. からだの科学「増刊」新興再興感染症-SARS の教訓. 58-60, 日本評論社, 2004.
- 4) 李 天成, 武田直和, 宮村達男: E 型肝炎. からだの科学「増刊」新興再興感染症. 日本評論社, 61-66, 2004.
- 5) 李 天成, 武田直和, 宮村達男: E 型肝炎ワクチン. ウイルス性肝炎 (下). 日本臨床社, 548-553, 2004.
- 6) 李 天成, 貞升健志, 岡田峰幸, 田中智之, 近平雅嗣, 左近直美, 榮 賢司, 山下照夫, 武田直和: E 型肝炎検査マニュアル. 2004.
- 7) 武田直和, 李 天成, 宮村達男: HEV 粒子の構造. ウイルス性肝炎 (下). 日本臨床社, 501-503, 2004.
- 8) 武田直和, 李 天成, 宮村達男: HEV 抗体の検出法. ウイルス性肝炎 (下). 日本臨床社, 542-545, 2004.
- 9) 武田直和, 甲木和子, 清水博之: AHC 検査マニュアル. 2004.
- 10) 武田直和, 下池貴志: 肝炎ウイルス. 厚生労働省 (ed): 食品衛生検査指針, 社団法人日本食品衛生協会, 475-480, 2004.
- 11) 武田直和: ウイルス性胃腸炎. 獣医公衆衛生学 第3版. 184-185, 2004.
- 12) 武田直和: ノロウイルス感染症. 感染症の事典 191-193, 2004.
- 13) 武田直和: 急性出血性結膜炎. 感染症の事典 60-61, 2004.
- 14) 武田直和: E 型肝炎. 感染症の事典 57-59, 2004.
- 15) 武田直和: E 型肝炎. 共通感染症ハンドブック 84, 2004.
- 16) 武田直和: E 型肝炎. 倉田毅 (ed): 家庭医学大百科, 法研, 2004.
- 17) 武田直和: ウイルス総論. 厚生労働省 (ed): 食品衛生検査指針 社団法人日本食品衛生協会, 448-449, 2004.
- 18) 清水博之, 武田直和, 宮村達男: 不活化ポリオワクチン, *総合臨床* 53: 1860-1865, 2004.



## ウイルス第二部

- 19) 清水博之: 東アジア地域で分離されるエンテロウイルス 71 型の分子疫学. 病原微生物検出情報 25: 228-229, 2004.
- 20) 清水博之, 武田直和, 宮村達男: ポリオワクチン, 小児科診療 67: 1843-1850, 2004.
- 21) 清水博之: 急性灰白髄炎とポリオ様疾患「最新版 家庭医学大百科」(株)法研, p2632-2633, 2004.
- 22) 清水博之, 武田直和: ポリオ「ネオエスカ 感染症・アレルギーと生体防御」同文書院, p14-17, 2004.
- 23) 高尾信一, 下園広行, 柏 弘, 松原啓太, 坂野 堯, 池田政憲, 岡本尚子, 吉田 弘, 島津幸枝, 福田伸治: 本邦において初めて流行が確認された小児の human metapneumovirus 感染症の臨床的, 疫学的解析. 感染症学雑誌 78(2): 129-37, 2004.
- 24) 藤本嗣人, 近平正嗣, 吉田真策, 宗村徹也, 岡藤輝夫, 岡藤隆夫, 吉田 弘, 西尾 治, コクサッキーウイルス A 群 6 型によると考えられた脳炎ケースの臨床及び分子疫学的検討. 臨床とウイルス 33(3): 141-145, 2005.
- 25) 宮村達男. B型肝炎. Progress in Medicine, ライフ・サイエンス, 25: 265-266, 2005.
- 26) 米山徹夫, 清原知子, 下池貴志: A型肝炎 我が国の最近の発生動向を中心に. 臨床とウイルス. 32(3): 149-155, 2004.
- 27) 鈴木哲朗. C型肝炎ウイルスと肝発癌. 臨床とウイルス 32(3): 156-162, 2004.
- 28) 鈴木亮介, 鈴木哲朗. Non A-E: TTV のウイルス学, 今までにわかったこと, 病因的意義. 臨床とウイルス 32(3): 179-183, 2004.
- 29) 李 天成, 武田直和, 宮村達男: E型肝炎の最近の診断法, 感染方式 E型肝炎は人畜共通感染症か. 臨床とウイルス. 32(3): 170-178, 2004.
- 30) 片山和彦. カリシウイルスの命名法. 臨床とウイルス 32(5): 380-387, 2004.
- 31) 村上恭子, 鈴木哲朗. HCV の新たな感染系及び HCV-RNA 複製系の開発動向. 日本臨床 62: 111-115, 2004.
- 32) 相崎英樹, 鈴木哲朗. HCV-RNA 複製および HCV 増殖の分子メカニズム. 日本臨床 62: 81-84, 2004.
- 33) 鈴木哲朗, 松浦善治. HCV 感染レセプター. 肝疾患 Review 2004 117-120, 2004.
- 34) 戸塚敦子, 下池貴志, 米山徹夫: A型肝炎ワクチン. 小児科診療, 67(11): 1955-1960, 2004.
- 35) 下池貴志, 戸塚敦子: B型肝炎ワクチン. ワクチンの辞典・日本ワクチン学会編, 朝倉書店 pp 156-161, 2004.
- 36) 戸塚敦子, 下池貴志: A型肝炎ワクチン. ワクチンの辞典・日本ワクチン学会編, 朝倉書店 pp 162-167, 2004.
- 37) 戸塚敦子: A型肝炎. 感染症の辞典・国立感染症研究所学友会編, 朝倉書店 pp51-52, 2004.
- 38) 片山和彦: ノロウイルス感染症. Medical Practice 22: 863-865, 2005.
- 39) 白土(堀越)東子: ノロウイルスによる感染性胃腸炎の集団発生. 生活と環境, (財)日本環境衛生センター, 50: 8-13, 2005.
- 40) 白土(堀越)東子, 岡智一郎, 片山和彦, 武田直和: ノロウイルス研究の最近の動向. 感染・炎症・免疫 Vol 35, No.2, 2005.
- 41) 清水博之: ポリオウイルス感染症の実験室診断. 日本臨床 63, Suppl 7: 377-381, 2005.
- 42) 清水博之: 非ポリオエンテロウイルス感染症の実験室診断. 日本臨床 63, Suppl 7: 382-385, 2005.
- 43) 清水博之, 武田直和: 急性出血性結膜炎の実験室診断. 日本臨床 63, Suppl 7: 386-388, 2005.
- 44) 清水博之: エンテロウイルス 71 感染症の実験室診断. 日本臨床 63, Suppl 7: 389-392, 2005.
- 45) 清水博之, 吉田 弘, 宮村達男 (訳): 野生株ポリオウイルスの実験室封じ込めに関する WHO 世界的行動計画. ウイルス 55: 161-178, 2005.
- 46) 米山徹夫: A型肝炎. Progress in Medicine: ライフ・サイエンス, 25: 1197-1199, 2005.

## II. 学会発表

### 1. 国際学会

- 1) Murakami K, Ishii K, Yoshizaki S, Aizaki H, Tanaka K, Shoji I, Sata T, Suzuki T, Bartenschlager R, Miyamura T. Assembly of HCV-like particles in three-dimensional cultures. 11th International Symposium on Hepatitis C & Related Viruses, Heidelberg, Germany, October 3-7, 2004.

## ウイルス第二部

- 2) Moriishi K, Mochizuki R, Abe T, Mori Y, Moriya K, Koike K, Suzuki T, Miyamura T, Matsuura Y. PA28gamma-dependent degradation of HCV core protein in the nucleus in vivo. *ibid.*
- 3) Sakamoto S, Shiroki K, Suzuki R, Matsuura Y, Suzuki T, Miyamura T. HCV capsid assembly: role of basic residue clusters in the core protein. *ibid.*
- 4) Fukasawa M, Sato S, Yamakawa Y, Natsume T, Suzuki T, Shoji I, Aizaki H, Miyamura T, Nishijima M. Proteomic profiling of lipid droplet proteins in HCV core-expressing hepatoma cell lines. *ibid.*
- 5) Okamoto T, Kimura-Someya T, Moriishi K, Watanabe R, Ishii K, Nunberg JH, Suzuki T, Miyamura T, Matsuura Y. Polytopic topology of HCV E1 glycoprotein on the endoplasmic reticulum. *ibid.*
- 6) Shirakura M, Shoji I, Ichimura T, Suzuki R, Suzuki T, Sugiyama Y, Shimoji T, Murakami K, Sato S, Fukasawa M, Yamakawa Y, Nishijima M, Miyamura T. Proteomic analysis of hepatitis C virus core-interacting proteins using a novel tandem affinity purification tag and mass spectrometry. *ibid.*
- 7) Takeda N. Risk factors of hepatitis E viruses. Symposium on Hepatitis E Virus, New Delhi, India, Feb 18, 19, 2005.
- 8) Miyamura T. Characterization of self-assembled virus-like particles of genotype III and IV hepatitis E virus generated by recombinant baculoviruses. *ibid.*
- 9) 宮村達男. Current situation of Polio and polio vaccination in Japan. 21世紀初頭における予防接種. 2nd International Workshop on Vaccinology. July 2, 2005.
- 10) Hansman GS, Natori K, Oka T, Takeda N, Katayama K: Cross-reactivity among sapovirus recombinant capsid proteins. In 2nd International calicivirus conference. Dijon, France, Nov, 2004.
- 11) Tanaka T, Kitamoto N, Kamata K, Miyoshi T, Uchino K, Oseto M, Sakae S, Kobayashi S, Natori K, H. Y, Jiang X, Gaham DY, Estes MK, Takeda N: Diagnostic kit for norovirus infection. *ibid.*
- 12) Oka T, Katayama K, Ogawa S, Hansman GS, Kageyama T, Miyamura T, Takeda N: In vitro proteolytic processing and identification of the cleavage site of sapovirus ORF1. *ibid.*
- 13) Katayama K, Oka T, Ogawa S, Shirato H, Miyamura T, Takeda N: Study on norovirus replication in vitro. *ibid.*
- 14) Katayama K, Oka T, Ogawa S, Shirato H, Miyamura T, Takeda N: Analysis of norovirus replication using full-length genome. In Seventh International Symposium on Positive-Strand RNA Viruses. San Francisco, May, 2004.
- 15) Li T-C, Nagata N, Tanaka K, Ochiai S, Isiko H, Takeda N, Miyamura T: Characterization of self-assembled virus-like particles of genotype IV hepatitis E virus generated by recombinant baculoviruses. *ibid.*
- 16) Hansman GS, Katayama K, Oka T, Natori K, Ogawa S, Ushijima H, Takeda N: Expression of human Sapovirus virus-like particles. *ibid.*
- 17) Oka T, Katayama K, Ogawa S, Hansman GS, Ushijima H, Miyamura T, Takeda N: In vitro proteolytic processing of the sapovirus ORF1 polyprotein. *ibid.*
- 18) Xing L, Wang J, Li T-C, Takeda N, Miyamura T, Anderson D, Purcell R, Cheng H: Role of ORF2 C-terminal region in assembly of HEV virus-like particle. *ibid.*
- 19) Takeda N, Suzaki Y, Ami Y, Li T-C, Mason HS, Arntzen CJ, Miyamura T: Challenges in creating a vaccine to prevent hepatitis E. In Plant-derived Vaccines and Antibodies: Potential and Limitations. Veyrier du Lac, France, March 21-24, 2004.
- 20) Li T-C, Nagata N, Tanaka K, Ochiai S, Ishiko H, Takeda N, Miyamura T: Characterization of self-assembled virus-like particles of genotype IV hepatitis E virus generated by recombinant baculoviruses. 第5回日中ウイルス学会. 大阪, June 10-11, 2004.
- 21) Tanaka T, Kitamoto N, Kamata K, Miyoshi T, Iwagami Y, Oseto M, Sakae K, Uchino K, Yoshida H, Jiang X, Estes MK, Natori K, Takeda N: Development of norovirus diagnostic assay system. *ibid.*
- 22) Li T-C, Takeda N, Miyamura T: Characterization of self-assembled virus-like particles of genotype III and IV hepatitis E virus generated by recombinant baculoviruses. In 40th Anniversary US-Japan Cooperative Medical Science Program. Kyoto, Japan, Dec, 2004.
- 23) Tanaka T, Kitamoto N, Ito K, Kamata K, Miyoshi T, Uchino K, Oseto M, Sakae K, Kobayashi S, Natori K,

## ウイルス第二部

Yoshida H, Jiang X, Gaham DY, Parker T, Estes MK, Takeda N: Development of immunochromatography kit for rapid diagnosis of norovirus infection. *ibid.*

24) Li T-C, Takeda N, Miyamura T: Characterization of self-assembled virus-like particles of genotype 3 and 4 hepatitis E viruses generated by recombinant baculoviruses. In Fuji Forum. Aug 10-11, 2004.

25) Shimizu H, Thao NTT, Tu PV, Binh NT, Thanh NTH: Circulation of enterovirus 71 in the western pacific region JSPS workshop on infectious diseases in Vietnam, Nagasaki, Nov. 2004.

26) Arita M, Zhu SL, Yoshida H, Yoneyama H, Miyamura T, Shimizu H: A type 3 poliovirus recombinant contains a sequence highly homologous with indigenous human enterovirus species C in viral polymerase coding region. EUROPIC 2005 XIIIth Meeting, Lunteren, Netherlands, May 23-29, 2005.

27) Shimizu H, Utama A, Nishimura Y, Miyamura T: Construction and characterization of chimeric polioviruses between a type 1 vaccine-derived poliovirus and species C enteroviruses. *ibid.*

28) Shimizu H: Surveillance, epidemiology and laboratory diagnosis for enterovirus infections. Emerging and Re-emerging Infectious Disease Symposium, Taipei, June, 2005.

29) Shimizu H: Vaccine-derived polioviruses - current understanding and the implication for laboratory diagnosis. Seminar on Eradication of Vaccine Preventable Diseases (II), Kumamoto, July, 2005.

### 2. 国内学会

1) 米山徹夫: A 型肝炎. 第3回トラベラーズワクチンフォーラム, 東京, 2004年6月.

2) 清原知子, 下池貴志, 米山徹夫, 宮村達男: 参照 B 型肝炎ワクチンを用いた *in vitro* 試験法の基礎的検討. 第8回日本ワクチン学会・学術集会, 札幌市, 2004年10月9, 10日.

3) 永田典代, 岩崎琢也, 清水博之, 原嶋綾子, 波多野いく持, 吉河智城, 佐多徹太郎, 野本明男, 倉田 毅: ポリオウイルスレセプター導入トランスジェニックマウス

(TgPVR21)を用いたポリオウイルス経粘膜免疫実験モデルの確立. 同上.

4) 石井孝司, 町田早苗, 鈴木亮介, 吉崎佐矢香, 森川茂, 水谷哲也, 田口文広, 田代真人, 横田恭子, 高須賀直美, 大西和夫, 鈴木哲朗, 宮村達男: 高度弱毒化ワクチニアウイルス株 DIs の組換え生ワクチンとしての応用. 同上.

5) 名取克郎: ノロウイルス, サポウイルス中空粒子の発現とその利用. 第16回ウイルス性下痢症研究会, 東京, 2004年11月20日.

6) 岡智一郎: 7th International Symposium on positive-strand RNA viruses の報告. 同上.

7) 片山和彦: カリシウイルスのデータベース構築. 同上.

8) 片山和彦, 岡智一郎, 白土東子, 松原尚子, 影山 努, 小川智子, 宮村達男, 武田直和: ノロウイルス全長 cDNA クローンを用いた複製機構の解析. 第52回日本ウイルス学会, 横浜, 2004年11月21-23日.

9) 白土(堀越)東子, 名取克郎, 小川智子, Hansman Grant, 鎌田公仁夫, 影山 努, 片山和彦, 宮村達男, 武田直和: カリシウイルスと血液型物質との結合の解析. 同上.

10) 岡智一郎, 小川智子, Hansman Grant, 影山 努, 片山和彦, 宮村達男, 武田直和: サポウイルス ORF1 のプロセッシング産物の同定と切断地図の作製. 同上.

11) 影山 努, 小嶋滋之, 李 天成, 片山和彦, 武田直和: 蛍光プローブを用いた HEV の高感度検出法および遺伝子型識別法の開発. 同上.

12) 内野清子, 三好龍也, 田中智之, 片山和彦, 武田直和: ノロウイルス遺伝子型別の解析からみたウイルス浸淫状況の把握. 同上.

13) 松原尚子, Hansman Grant, 名取克郎, 岡智一郎, 普後 一, 濱野國勝, 宮村達男, 武田直和, 片山和彦: サポウイルス粒子形成機構の解析. 同上.

14) Hansman Grant, 名取克郎, 岡智一郎, 小川智子, 牛島廣治, 武田直和, 片山和彦: Cross-reactivity among sapovirus recombinant capsid proteins. 同上.

15) 伊藤 雅, 三好龍也, 田中智之, 山下照夫, 小林慎一, 藤浦 明, 李 天成, 武田直和, 宮村達男, 榮 賢司: 野生動物の E 型肝炎ウイルス (HEV) および HEV

## ウイルス第二部

抗体保有状況. 同上.

16) 高村史記, 新倉昌浩, 横田恭子, 李 天成, 武田直和, 宮村達男, 保富康宏: DNA ワクチン封入キメラ VLP 経口投与による粘膜誘導ワクチンの試み. 同上.

17) 李 天成, 恒光 裕, 永田典代, 宮村達男, 武田直和: 3 型 HEV 構造蛋白の発現と抗原性の解析. 同上.

18) 清水博之, Chen Li, Andi Utama, 有田峰太郎, 宮村達男: カンボジアで分離された新たな A 群エンテロウイルスの遺伝子解析. 同上.

19) 有田峰太郎, 清水博之, 永田典与, 網 康至, 須崎百合子, 佐多徹太郎, 岩崎琢也, 宮村達男. エンテロウイルス 71 温度感受性変異株の神経毒性に関する解析. 同上.

20) 村上恭子, 石井孝司, 吉崎佐矢香, 相崎英樹, 田中恵子, 勝二郁夫, 佐多徹太郎, 鈴木哲朗, 宮村達男: 三次元肝細胞培養システムによる C 型肝炎ウイルス (HCV) 粒子形成. 同上.

21) 白倉雅之, 勝二郁夫, 市村 徹, 鈴木亮介, 鈴木哲朗, 梶山裕一, 下地 徹, 村上恭子, 佐藤滋子, 深澤征義, 山河芳夫, 西島正弘, 宮村達男: MEF tag 精製-プロテオーム解析による C 型肝炎ウイルス Core 蛋白新規結合因子の同定. 同上.

22) 石井孝司, 横田恭子, 竹森利忠, 長谷川秀樹, 水谷哲也, 森川 茂, 田口文広, 田代真人, 吉崎佐矢香, 鈴木哲朗, 宮村達男: 高度弱毒化ワクチニアウイルス株 (感染研) DIs の SARS 生ワクチンとしての応用. 同上.

23) 町田早苗, 松井政則, 石井孝司, 鈴木亮介, 鈴木哲朗, 宮村達男, 赤塚俊隆: HCV envelope E1(signal peptide)-E2 をコードする DNA を用いた HCV E2 特異的 CTL の誘導. 同上.

24) 鈴木亮介, 坂本真一郎, 下池貴志, 森石恆司, 松浦善治, 宮村達男, 鈴木哲朗: C 型肝炎ウイルスコア蛋白質の小胞体, ミトコンドリア, 核への局在を規定するシグナルの解析. 同上.

25) 森石恆司, 中村理加, 宮本大伸, 鈴木哲朗, 森屋恭爾, 小池和彦, 宮村達男, 松浦善治: HCV コア蛋白質の局在および病原性発現における PA28 の役割. 同上.

26) 林 昌宏, 菰田泰正, 鈴木健介, 谷 英樹, 大椿朋子, 松尾栄子, 津田祥美, 森石恆司, 宮村達男, 松浦善治: HCV 感染におけるヒト繊維芽細胞成長因子受容体の

役割. 同上.

27) 飯島沙幸, 石井孝司, 李 永仲, 岩田奈織子, 八木慎太郎, 山口健次郎, 槇 昇, 吉崎佐矢香, 町田早苗, 木村展之, 鈴木哲朗, 佐多徹太郎, 宮村達男, 明里宏文: C 型肝炎のサル病態モデル開発. 同上.

28) 米山徹夫, 下池貴志, 清原知子, 戸塚敦子, 宮村達男: 合成 siRNA による HAV の増殖抑制. 同上.

29) 勝二郁夫, 白倉雅之, 市村 徹, 鈴木亮介, 鈴木哲朗, 梶山裕一, 下地 徹, 村上恭子, 佐藤慈子, 深澤征義, 山河芳夫, 西島正弘, 宮村達男: MEF タグ精製-プロテオーム解析による C 型肝炎ウイルス Core 蛋白新規結合因子の同定. 第 27 回日本分子生物学会年会, 神戸市, 2004 年 12 月 8-11 日.

30) 下地 徹, 勝二郁夫, 梶山裕一, 松田麻未, 宮村達男: HPV16E6 蛋白質と結合する宿主蛋白質 E6AP の機能調節機構の解析. 同上.

31) 武田直和, 李 天成, 宮村達男. VLP 作製と E 型肝炎研究. 第 15 回感染研シンポジウム, 東京, ?.

32) 白土 (堀越) 東子, 小川智子, 鎌田公仁夫, 影山 努, 片山和彦, 宮村達男, 武田直和: ノロウイルスの最近の動向. 衛生微生物技術協議会第 26 回研究会, 福井市, 2004 年 7 月 8 日.

33) 宮村達男: 教育講演 "ポリオ根絶への途". 同上.

34) 武田直和: 平成 17 年度第 1 回食品衛生監視委員等研修会, 宇都宮市, 2004 年 7 月 22 日.

35) 武田直和: 食習慣の落とし穴: わが国の E 型肝炎とリスクファクター. 第 23 回和歌山県感染症化学療法研究会. 和歌山, 2004 年 4 月 17 日.

36) 玉田陽子, 弘 八, 矢野公士, 福田実可, 学 大, 矢野右人, 石橋大海, 李 天成, 宮村達男, 武田直和: E 型肝炎診断の問題点: HEV 抗体の感度と特異性に関する検討. 第 40 回日本肝臓学会総会. 東京, 2004 年 6 月 3, 4 日.

37) 武田直和: わが国における E 型肝炎. 第 45 回日本臨床ウイルス学会. 大阪, 2004 年 6 月 12, 13 日.

38) 李 天成, 武田直和, 宮村達男: HEV 感染の現状と検査法. I 衛生微生物技術協議会第 25 回研究会. さいたま市, 2004 年 7 月 8-9 日.

39) 片山和彦, グラント・ハンスマン, 岡智一郎, 牛島廣治, 三好龍也, 田中智之, 宮村達男, 武田直和:

## ウイルス第二部

Sapovirus ゲノムの解析. 同上.

40) 清水博之, アンディ・ウタマ, 有田峰太郎, 宮村達男: エンテロウイルスの分子進化とゲノム遺伝子組換え. 同上.

41) 有田峰太郎, 祝 双利, 清水博之, 宮村達男: C 群エンテロウイルスの分子疫学. 同上.

42) 武田直和: わが国における E 型肝炎. 第 2 3 回北陸実験動物研究会, 富山, 2004 年 10 月 2 日.

43) 武田直和: 話題の小型球形ウイルス. 第 9 回浜松新興再興感染症講演会, 浜松, 2004 年 11 月 26 日.

44) 白土(堀越)東子, 名取克郎, 小川智子, 鎌田公仁夫, 影山 努, 片山和彦, 宮村達男, 武田直和: カリシウイルスと血液型物質との結合の解析. 第 27 回日本分子生物学会年会. 神戸市, 2004 年 12 月 8-11 日.

45) 武田直和: ウイルス性食中毒の予防 ノロウイルスや肝炎ウイルス. 平成 16 年度厚生労働科学研究(食品の安全性高度化推進研究推進事業)シンポジウム「食の安全と科学」, 東京, 2005 年 1 月 25 日.

46) 武田直和: わが国における E 型肝炎. 第 139 回獣医学会公衆衛生学分科会シンポジウム, 新潟, 2005 年 2 月 11 日.

47) 武田直和: わが国における E 型肝炎. 平成 16 年度希少感染症診断技術研修会. 東京, 2005 年 2 月 22 日.

48) 米山徹夫: A 型肝炎ウイルス. 第 139 回日本獣医学会, 東京, 2005 年 3 月.

49) 吉田 弘: ポリオ根絶計画と環境ウイルスサーベイランス, 第 8 回マリンバイオテクノロジー学会, 熊本市, 2005 年 5 月 28, 29 日.

50) 岩井雅恵, 松浦久美子, 永井美之, 吉田 弘: 2002 - 2003 年富山県内河川水から分離されたエコーウイルス 13 型について. 第 46 回日本臨床ウイルス学会, 福岡市, 2005 年 6 月 4 日.

51) 清水博之: ポリオ根絶をめざして. 第 6 回感染症フォーラム「感染症の制御戦略」, 大阪市, 2005 年 2 月.

52) 清水博之: ポリオ根絶の進展とポリオウイルスの実験室封じ込め. 平成 16 年度希少感染症診断技術研修会. 東京, 2005 年 2 月.

53) 清水博之, 宮村達男: ワクチン由来ポリオウイルスによるポリオ流行. 第 79 回日本感染症学会, 名古屋市, 2005 年 4 月.

54) 宮村達男, 清水博之: ポリオ根絶計画の進展とポリオワクチン戦略. 同上.

55) 佐藤慈子, 深澤征義, 山河芳夫, 夏目 徹, 鈴木哲朗, 勝二郁夫, 相崎英樹, 鈴木亮介, 宮村達男, 西島正弘: プロテオミクス的手法を用いた C 型肝炎ウイルスの病原性に関する宿主因子の探索. 第 125 年会日本薬学会, 東京, 2005 年 3 月 29 日-31 日.