

## 2. ウイルス第二部

部長 脇田隆宇 (H29. 9月まで)

部長 村松正道 (H29. 10月から)

### 概要

ウイルス第二部は、主として消化器系疾患の原因ウイルスを所掌とし、こ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、弱毒生ロタワクチンを担当し、また肝炎の様々なリファレンス業務を担当している。

第1室は下痢症ウイルスを担当するとともに、不活化ポリオワクチン、ロタワクチンの国家検定を担当している。不活化ポリオワクチンのうち、セービン株由来不活化ポリオワクチンを含む4種混合ワクチン(DPT-sIPV:沈降精製百日せき破傷風不活化ポリオ(セービン株)混合ワクチンは、一般財団法人阪大微生物病研究会(テトラビック皮下注シリンジ)、および、一般財団法人化学及血清療法研究所(クアトロバック皮下注シリンジ)から、合計11件の出検があり、ラット免疫原性試験による力価試験を実施した。また、4種混合ワクチンに用いる中間段階試験品(不活化ポリオ3価混合原液)は2件の出検があり、不活化試験を実施した。また、ソークワクチンについては、単独不活化ポリオワクチン(サノフィ:イモバックスポリオ皮下注)が2件、サノフィ社の不活化ポリオワクチンを含む沈降精製百日せき破傷風不活化ポリオ混合ワクチンDPT-cIPV(北里第一三共:スクエアキッズ皮下注シリンジ)が7件出検され、いずれもD抗原ELISAによる検定を実施した。ロタウイルスワクチンについてはGSK:ロタリックスが3件、MSD:ロタテックが8件出検され、検定を行った。ワクチン導入前後のロタウイルスの流行状況を把握するための研究、ロタウイルスの基礎研究が継続された。

ノロウイルスに関しては、ノロウイルスワクチンシーズの開発研究が終了し、ライセンス供与を受けた企業でワクチン生産が進行しつつある。ノロウイルスの流行予測プログラ

ムとして開発されたNoroCastは、さらなる精度向上のため全国の衛生研究所と協力しつつ、次世代シーケンサーを用いた下痢症ウイルス全ゲノム塩基配列解析と時系列分子系統解析が継続され、ゲノム全長データの蓄積が続いている。感染研ではリファレンスセンターとしての機能を果たすとともに、ノロウイルスを含むカリシウイルスに関する基礎研究が進展している。これまで一般的な培養細胞で増殖させることができなかったヒトノロウイルスについて、慶応大学医学部との共同研究ならびに米国ベイラー医科大学との共同研究により、ヒト腸管オルガノイドを用いた安定的な培養増殖系が確立されつつある。オルガノイド系はノロウイルス複製機構、病原性発現機構解明の基盤となるばかりでなく、ノロウイルス不活化剤、治療薬、予防薬、ワクチン等の評価系として活用できると期待される。

第2室はWHO世界ポリオ根絶計画に参画している。WHOの指定をうけて、世界の特殊専門ラボとして、また西太平洋地域の指定ラボとして世界各地で分離されるポリオウイルスの性状解析を続けた。西太平洋地域では2000年以来ポリオフリーを維持してきた。西太平洋地域以外でも野生株ポリオ流行国は残り3ヶ国となり、いよいよ世界的ポリオ根絶達成およびその後のOPV接種停止が視野に入ってきている。ワクチン接種率の低いハイリスク地域では、ワクチン由来ポリオウイルスの流行に、依然留意が必要とされる。糞便および環境水検体からポリオウイルスを直接検出・同定する手法の検討を進め、ポリオウイルスを迅速かつ高感度に検出する系の実用化を検討している。WHOは2014年12月にポリオウイルス病原体バイオリスク管理に関する新たなWHO行動指針(GAP III)を公開した。我が国でも本指針に対応しバイオリスク管理体制の整備を進めている。また、JICAとの共催により実施した第27回

## ウイルス第二部

ポリオ実験室診断技術研修会(ポリオ及び風疹を含むワクチン予防可能疾患の世界的制御のための実験室診断技術としては第8回目)ではポリオ・麻疹流行国など各国からの参加者に対して講義および実習を実施した。国内エンテロレファレンスセンターとしてレファレンス活動、行政検査をおこなった。また、抗ピコルナウイルス化合物 MDL-860 による PI4KB 阻害機構の解析を進めた。

第3室および第4室ではB型およびC型肝炎ウイルスの行政研究および基礎研究をおこなった。行政研究としては、肝炎ウイルス感染の予防、肝炎ウイルスキャリア対策、肝癌死亡の減少に貢献することを目的として、肝炎情報の収集とウイルス第二部のホームページにおいてデータベース構築および情報発信をおこなっている。検診で発見されるキャリアの治療導入が重要であり、肝炎ウイルス検査陽性者のフォローアップに関しては自治体、分担研究者、拠点病院と連携して全国の県、市町村にて、肝炎ウイルス検査陽性者をフォローアップしている。厚生労働省肝炎総合対策推進国民運動事業「知って、肝炎プロジェクト」と共同して、感染研の一般公開に元プロレスラーの小橋健太氏を招き、肝炎ウイルス検査の重要性等の広報活動を行った。基礎研究促進を目的に、肝炎研究基盤整備事業で肝炎セミナーを開催した。さらに、3月には国内の肝炎ウイルス研究者による肝炎ウイルス研修会を開催し、若手研究者の育成に努めた。B型肝炎ウイルスの研究では、新規感染阻害剤を複数同定する成果を挙げた。さらに、ウイルス複製増殖に関わる宿主因子とその機序を明らかにした。C型肝炎ウイルス研究も様々な研究課題が展開されているが、Direct Active Antiviral(DAA)による画期的な抗ウイルス療法の登場により、今後の研究の方向性を検討する時期にある。より効果的で安価な治療法の開発、感染予防法の開発が求められる。

第5室はA型およびB型肝炎ワクチンの検定、検査を担当している。本年度はA型肝炎ワクチン1件、B型肝炎ワクチン31件の検定をおこなった。B型肝炎ワクチンが平成28年10月より定期接種化されたため、出検数が大幅に増加した。肝炎ワクチンは動物を用いた力価試験を実施しているが、試験管内力価試験への切り替えが望まれる。A

型肝炎ウイルスの研究では、2017年のA型肝炎の流行状況の分子疫学的解析を行った。また、A型肝炎抗体保有状況の全国規模の血清疫学調査を1973年から約10年おきに実施しており、本年度は2013年から2017年にかけて採血された検体を用いて抗体測定を行った。

人事面では、定員削減の影響もあり新規の職員採用が困難な状況が続いているが、平成29年10月に、副所長と部長の兼任であった脇田部長が副所長専任となり、金沢大学より新部長の村松が着任した。ウイルス第二部での脇田隆字先生のご尽力に感謝する。平成29年12月より、吉田和央研究員が任期付研究員として第二室に配属された。平成30年1月より、第1室の染谷雄一主任研究員が第1室の室長に選任された。

以下のような国際的技術協力をおこなった。

### 第1室

Ya-Ling Tzeng(曾雅鈴)(台湾CDC)平成30年3月26日～平成30年3月30日、下痢症ウイルス検出の研修

### 第2室

Dr. Zayyin Dinana(インドネシア・アイルランガ大学)平成29年7月3日～平成29年7月14日、下痢症ウイルスの次世代シーケンス、分子疫学解析の研修

松井千絵子(神戸大学)平成29年7月3日～平成29年7月7日、下痢症ウイルスの検出、分子疫学解析の研修

Dr. Francis Ekow Dennis(野口記念医学研究所)平成29年12月11日～22日、下痢症ウイルス次世代シーケンス解析の研修

### 第5室

白慧敏(中国内モンゴル包頭医科大学)＜中国留学基金派遣＞平成28年12月～平成29年12月、E型肝炎ウイルスの分子生物学に関する研究

Xiao Gong. 中国広東CDC. 平成29年11月26日～平成29年12月9日。E型肝炎ウイルスとA型肝炎ウイルスの検査法に関する研修

## ウイルス第二部

Li Wei. 中国広東 CDC. 平成 29 年 11 月 26 日～平成 29 年 12 月 9 日。E 型肝炎ウイルスと A 型肝炎ウイルスの検査法に関する研修  
張文静 (中国山東省輸血研究所) <中国留学基金派遣>  
平成 29 年 12 月～平成 31 年 12 月、E 型肝炎ウイルスの分子生物学に関する研究

第3室

体外診断薬承認前試験; ルミパルスプレスト オーソ HCV 抗原 (富士レビオ株式会社)

第5室:

A 型肝炎 4 件 6 検体  
B 型肝炎 1 件 17 検体  
E 型肝炎 5 件 8 検体

### <別> 検査業務

#### 検定業務

第1室:

- ・沈降精製百日せきジフテリア破傷風不活化ポリオ(セービン株)混合ワクチン(テトラビック) 5件
- ・沈降精製百日せきジフテリア破傷風不活化ポリオ(セービン株)混合ワクチン(クアトロバック) 6件
- ・沈降精製百日せきジフテリア破傷風不活化ポリオ(セービン株)混合ワクチン(ポリオ原液:中間段階) 2件
- ・不活化ポリオワクチン(ソークワクチン)(イモバックスポリオ) 2件
- ・沈降精製百日せきジフテリア破傷風不活化ポリオ(ソークワクチン)混合ワクチン(スクエアキッズ) 7件
- ・経口弱毒生ヒト rota ウイルスワクチン(ロタリックス) 3件
- ・5価経口弱毒生 rota ウイルスワクチン(ロタテック) 8件

第5室:

- ・乾燥組織培養不活化A型肝炎ワクチン(エイムゲン) 1件
- ・組換沈降B型肝炎ワクチン(酵母由来)(ビームゲン) 4件
- ・組換沈降B型肝炎ワクチン(酵母由来)(ヘプタバックスII) 26件
- ・次期参照沈降A型肝炎ワクチンの値付け 2回(3回繰り返しのうちの2回)

#### 行政検査

第2室

エンテロウイルス検出試験

合計 1 件(6 検体)

業績

調査・研究

I. 下痢症ウイルスに関する研究

(1) ヒト腸管オルガノイド培養のコスト削減の試み

ヒト腸管オルガノイド培養に用いる培地 (CMGF+/WENRAS) は成長因子を多数含む。このうち Wnt3a, R-spondin1 及び Noggin の精製タンパク質が高価なため、培養コストを押し上げている。そこで3つの成長因子を培養細胞株産生リコンビナントタンパク質に置き換え、引き続き安定的に培養できることを確認した。この結果、CMGF+/WENRAS の価格を約 1/7 に削減できた。また GII.4 ノロウイルスに対する感受性を維持していることも確認した。

[村上耕介, 藤本陽, 片山和彦 (北里大学), 染谷雄一, Estes MK (バイラー医科大学)]

(2) 胆汁要求性ノロウイルス GII.3 のオルガノイドへの感染メカニズムの解析

GII.3 ノロウイルスのオルガノイドへの感染への胆汁酸がどのように関与するのかを解析するため、13種の胆汁酸を用いて GII.3 の感染実験を行った。その結果、抱合胆汁酸の多くが GII.3 の感染を誘導することを明らかにした。また胆汁酸の疎水度と GII.3 の複製効率との間に正の相関性を見出した。

[村上耕介, Tinge VR, Ettayebi K, Crawford SE, Neill FH, Ramani S, Zeng X, Atmar RL, Estes MK (バイラー医科大学)]

(3) ノロウイルス VLP の X 線結晶構造解析

ノロウイルスチバ株 (GI.4) の直径 38 nm の VLP を昆虫細胞で調製し、高輝度光科学研究センターにおいてその三次元結晶を得た。現在、X 線結晶構造解析を進めている。

[染谷雄一、長谷川和也 (高輝度光科学研究センター)、熊坂崇 (高輝度光科学研究センター)]

(4) ノロウイルス VLP の電子顕微鏡単粒子解析

ノロウイルス GI 株 (GI.1~GI.9) の VLP を昆虫細胞で調製し、理化学研究所ライフサイエンス技術基盤研究センターにおいて電子顕微鏡単粒子解析を実施した。いくつかの株について電子顕微鏡単粒子解析を進めている。また、Pドメインタンパク質を大腸菌で発現させ、三次元結晶化を進めている。

[染谷雄一、染谷友美 (理化学研究所)]

(5) ファージディスプレイ法によるヒト型抗ノロウイルス抗体の単離と応用

本研究では、ヒト由来ファージ抗体ライブラリーから多数の抗ノロウイルス (NoV) 抗体を単離・解析し、交叉反応性抗 NoV 中和抗体の作製を試みる。これまでに、ウイルス様空粒子 (VLP) を抗原に用い、遺伝子型特異的、遺伝子群内交叉反応性、そして遺伝子群間交叉反応性のヒト型抗 NoV ファージ抗体を単離してきた。今年度までに、交差反応性の高い抗体は、他の遺伝子型株の血液型抗原への結合も阻害したのに対し、交差反応性の低い抗体は、他の遺伝子型株の血液型抗原への結合は阻害しないことを明らかにしている。

[白土東子, 守口匡子 (藤田保健衛生大学), 染谷雄一, 奥野良信 (阪大微研), 黒澤良和 (藤田保健衛生大学)]

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

磁性粒子と光信号用マーカーで検出対象をサンドイッチすることで「動く光点」を作り出し検出する外力支援近接場照明バイオセンサ (EFA-NIBiosensor) を用いて、実環境サンプルに添加した NoVVLP の検出を行う。EFA-NI バイオセンサは、原理上既存の手法に比べシグナルとノイズの区別が容易である。今年度は、EFA-NI バイオセンサの実環境サンプルへの適合性評価を行った。その結果、洗浄や前処理を行わずに、トイレより回収したサンプルに添加された NoVVLP の検出に成功し、実環境サンプルへの適合性が証明された。

[白土東子, 安浦雅人 (産総研), 守口匡 (藤田保健衛生大学), 藤巻真 (産総研)]

(7) ノロウイルス RNA 依存的 RNA ポリメラーゼの遺伝子型による RNA 合成速度の測定

これまでに構築したノロウイルスの RNA 依存的 RNA ポリメラーゼ(RdRp)の in vitro RNA 転写活性測定系を用いて、遺伝子型 GI.1, GII.3, 及び GII.4 の RdRp の RNA 合成速度を測定した。その結果、GII.4 は、GI.1, GII.3 に比べて約 2 倍 RNA 合成速度が大きいことを示唆する結果を得た。この結果は GII.4 型が長年にわたり流行している理由を考える上で興味深いと考えられる。

[下池貴志、脇田隆宇、村松正道]

(8) インドネシアにおける無症候ノロウイルス感染者の分子疫学解析

インドネシア、スラバヤ市の健康なボランティアから継続的に糞便検体を収集し、便中に存在するノロウイルスゲノムの疫学解析を進めた。2015～2016年に18人の健康なボランティア(無症候者)から512検体を収集した。糞便検体から RT-PCR 法にてノロウイルスゲノムを増幅し、シーケンス解析を行った結果、512検体中14検体(2.7%)がノロウイルス陽性であり、すべてが遺伝子型 GII であった。陽性14検体について分子系統樹解析により、10検体(71.4%)が GII.2、2検体(14.3%)が GII.17、1検体(7.1%)が GII.4 Sydney2012、1検体(7.1%)が GII.1 の遺伝子型と同定された。さらに詳細に解析したところ、GII.Pg/GII.1 と GII.Pe/GII.4 Sydney2012 という異なる遺伝子型同士の組換えノロウイルスが検出された。7人の無症候者のうち、2人において、同じ遺伝子型あるいは異なる遺伝子型株による反復感染が認められた。以上の結果から、無症候者に高率にノロウイルスが感染していることが明らかになり、インドネシアにおけるノロウイルス伝播および下痢症流行に無症候者が感染源として重要であることが示唆された。

[内海孝子、勝二郁夫(神戸大学)、Maria Inge Lusida(アイルランガ大学)、片山和彦(北里大学)、Yen Hal Doan]

(9) インドネシアで検出された急性胃腸炎ウイルスの次世代シーケンスによる網羅的遺伝子解析

インドネシアにおける2015-2016年の急性胃腸炎症例由来糞便検体は、それぞれ、31%および17.5%がロタウイルスあるいはノロウイルス陽性であった。本研究期間では、GII.4 が下痢症入院患者における主要なノロウイルス遺伝子型であったが、遺伝子型 GII.13 株が2番目に高頻度に検出された(17%)。日本を含むアジア地域での検出が相次いでいる新たな遺伝子型 GII.17-GII.17 株は、インドネシアでは3番目のノロウイルス遺伝子型であった。インドネシアでは、2014年に非典型 G1P[8] DS-1 like RVA が検出されたが、2015-2016年には、ウマ VP7 近縁遺伝子および DS-1-like 遺伝子構成を有する G3P[8]/P[6] 株が広範に伝播し主要なロタウイルス遺伝子型であった。インドネシアのロタウイルス遺伝子型解析を継続したところ、2016-2017年にかけても、引き続き同遺伝子型が高頻度に検出された。

[内海孝子、勝二郁夫(神戸大学)、Rury MegaWahyuni(アイルランガ大学)、片山和彦(北里大学)、清水博之、Yen Hal Doan]

2. サポウイルスに関する研究

(1) サポウイルスのゲノム解析

サポウイルスのゲノム多様性の解明および現在より精度の高いサポウイルス核酸検出系の改良構築を目的として、ヒト由来サポウイルス株のうち、フルゲノム配列が報告されていない遺伝子型の株を中心に long PCR、次世代シーケンサー、5'-RACE を組み合わせ、新たに GI.3, GI.4, GI.6, GI.7, GII.7 の遺伝子型についてそのフルゲノム配列を決定した。残る GII.8 株もほぼフルゲノムの配列の報告がなされたため、全ての遺伝子型のフルゲノム配列の情報を得ることができた。

[岡智一郎、Yen Hai Doan, 入谷展弘(大阪健康安全基盤研究所)、岡田峰幸(東総食肉衛生検査所)、小川知子(千葉県衛生研究所)、飯塚節子、辰巳智香(島根県保健環境科学研究所)、原田誠也(熊本県保健環境科学研究所)]

(2) 改良版サポウイルス核酸定量検出系構築の試み

新たに蓄積したサポウイルスゲノム配列、データベースに報

告済みの配列に基づき、リアルタイム RT-PCR 系改良のためのプライマー、プローブのデザインを行い、ターゲット領域を含むプラスミド DNA を使った評価を行い、適切なプライマー、プローブ候補の組み合わせを選定した。

[岡智一郎]

### (3) ブタサポウイルス感受性細胞の検索

ブタサポウイルスの感受性細胞としてはブタ腎臓由来細胞(LLC-PK1 細胞)のみが知られている。今回、異なるブタ組織由来の感受性細胞を新たに見出した。ブタサポウイルス感受性細胞はいずれもウイルス増殖に胆汁酸由来成分が必要であった。ヒト由来サポウイルスの培養細胞での増殖はまだ達成されていないため、ウイルス感受性規定因子の検索への有用性が期待される。

[高木弘隆{バイオセーフティ管理室}、岡 智一郎]

## 3. カリシウイルスに関する研究

### (1) カリシウイルス増殖阻害化合物の作用メカニズムの解析

培養細胞での効率的な増殖が可能なカリシウイルス(マウスノロウイルス、ブタサポウイルス、ネコカリシウイルス)をすべて阻害する化合物、テアフラビンについては、主にネコカリシウイルスを用いた検討により、ウイルスそのものに作用し、感染能を失わせていることが示された。

[大場舞(静環環衛研), 岡智一郎, 高木弘隆(バイオセーフティ), Qihong Wang, Linda J. Saif (オハイオ州立大), 安藤隆幸, 荒畑沙織, 池ヶ谷朝香, 小和田和宏, 川森文彦(静環環衛研), 小郷尚久, 浅井章良 (静岡県立大薬)]

## 4. 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) 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、2016年に北海道各地の病院で採取されたロタウイルス胃腸炎入院症例の便検体を収集した。NTT東日本病院(札幌市)、札幌北辰病院(札幌市)、滝川市立病院(滝川市)、岩見沢市立総合病院(岩見沢市)、苫小牧市立病院(苫小牧市)、製鉄記念室

蘭病院(室蘭市)、市立函館病院(函館市)、浦河赤十字病院(浦河町)、留萌市立病院(留萌市)の9か所から、それぞれ9、33、3、15、30、3、5、7、18検体(合計123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) 北海道のロタウイルス検体の NGS 解析

採取した RVA 陽性の 123 検体について、次世代シーケンサー(NGS)を行って全ゲノム配列を解析した。RVA の遺伝子型分布は DS-1-like G1P[8]が 2%、G2P[4]が 5%、AU-1-like G3P[9]が 1%、equine-like G3P[8]が 21%、G8P[8]が 2%、G9P[8]が 77%であり、G9P[8]が圧倒的優勢であった。4 検体は genotyping や PAGE でも検出できず、遺伝子型を特定できなかつた。苫小牧では新規流行株である equine-like G3P[8]が優勢(30 株中 18 株)となったが、他の多くの地域(札幌、岩見沢、室蘭、浦河、留萌)では G9P[8]が優勢であった。

[藤井克樹、津川毅(札幌医科大学)]

#### ウ) 北海道のロタウイルス遺伝子の系統樹解析

2016 年北海道の RVA 株について、各遺伝子の系統樹解析を行った。検出された G9P[8]株(73 株)はすべて前年までと同様の lineage 6 に属する株であった。G3 株(26 株)のうち 25 株は近年世界中で流行が見られている equine-like G3P[8](DS-1 型)であり、この株の日本国内への侵入が確認された。残りの 1 株は非常に稀な AU-1 型 G3P[9]株であり、ネコロタウイルスに近縁の配列を有していた。2016 年の北海道のロタウイルス流行株の遺伝子型分布は、2015 年の分布とは大きく異なっていた。

[藤井克樹、津川毅(札幌医科大学)]

### (2) 東京都におけるロタウイルス分子疫学研究

#### ア) 東京都のロタウイルス検体の NGS 解析

東京都健康安全研究センターとの共同研究で、東京都におけるA群ロタウイルス(RVA) 流行株を調査するため、同センターが2016年度に依頼を受けて検査したロタウイルス陽性検体について、感染研でより詳細な次世代シーケンサーによる全ゲノム解析を行った。32検体のうちG2P[4]が13

検体(41%)、human G3P[8]が1検体(3%)、equine-like G3P[8]が8検体(25%)、G8P[8]が3検体(9%)、G9P[8]が5検体(16%)であり、2検体はG2P[4]とG9P[8]の重複感染であった。

[藤井克樹、小田真悠子(東京都健康安全研究センター)、宗村佳子(東京都健康安全研究センター)]

#### イ) 東京都のロタウイルス遺伝子の系統樹解析

2016年度に東京都で検出されたRVA株について、各遺伝子の系統樹解析を行った。検出されたG9P[8]株(重複感染を含め7株)のうち、1株はlineage 3であり、残りの6株はlineage 6であった。また、G3P[8]株(8株)のうち1株は従来から流行している典型的なヒトG3P[8]株(Wa型)であり、残りの7株はequine-like G3P[8]株(DS-1型)であった。各遺伝子の系統樹を見ると、東京都で検出されたequine-like G3P[8]株は北海道で検出された株とは異なる枝に分岐していることから、この株が流行し始めてから既に数年が経過していると考えられた。

[藤井克樹、小田真悠子(東京都健康安全研究センター)、宗村佳子(東京都健康安全研究センター)]

#### ウ) 核酸自動電気泳動装置によるロタウイルスゲノムのタイピング法の確立

大阪健康安全基盤研究所、名古屋市衛生研究所、山口県環境保健センターの3カ所の地方衛生研究所に協力を仰ぎ、核酸自動電気泳動装置MultiNA(島津製作所)を用いたRVAのタイピング法の性能について検討した。それぞれ、計51検体のロタウイルス陽性検体を用いて検証したところ、ロタウイルスの検出率は66.7%(34/51)で、そのうち遺伝子型の正答率は58.8%(20/34)であった。G1、G2、G9型については良好な正答率を示していたが、新規流行株であるウマ様G3型およびG8型の出現により正確な判定が困難になっている状況が判明した。現状でもWa型かDS-1型かの判定は可能であると考えられる。

[藤井克樹、左近直美(大阪健康安全基盤研究所)、高橋剣一(名古屋市衛生研究所)、岡本玲子(山口県環境保健センター)、片山和彦(北里大学・北里生命科学研究所)]

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

Geouveaらが1990年に報告したmultiplex-PCRによるロタウイルスVP7のgenotyping法は、これまで世界中で長く利用されてきたが、近年の流行株では誤判定となる例が散見されるようになった。検証の結果、ウマ様G3株はG1型として、G8株はG3型として誤判定され、G9 lineage3株は検出困難、G9 lineage6株はG8付近に非特異バンドが見られた。これらの不都合を解消するため、プライマーの再設計を行い、G1、G2、ヒトG3、ウマ様G3、G4、G8、G9型を正しく判定できるプライマーセットを開発し、各型のウイルス株を用いて実証した。

[藤井克樹、左近直美(大阪健康安全基盤研究所)、高橋剣一(名古屋市衛生研究所)、岡本玲子(山口県環境保健センター)、片山和彦(北里大学・北里生命科学研究所)]

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

[太田伸生(東京医科歯科大学)、Francis E. Dennis(Noguchi Memorial Institute for Medical Research)、片山和彦(北里大学)、清水博之、Yen Hal Doan]

#### 4. その他(品質管理に関する業務)

##### (1)ポリオワクチンのD抗原含量と免疫原性力価との関係に関する検討

日本で用いられているセービン株由来不活化ポリオワクチンを含む4種混合ワクチン製剤について、D抗原含量の低下が免疫原性力価と対応しているかを明らかにするため、まず、製剤の加温による劣化の程度を明らかにした。通常の保存条件(5±3℃)ではD抗原含量の顕著な変化は見られないのに対し、37℃で1週間静置するとおよそ10~20%にまで低下した。50℃で1週間静置でD抗原含量はほぼ消失した。今後、劣化ワクチンを用いて、ラットに対する免疫原性の比較を行う。

[染谷雄一]

##### (2)不活化ポリオワクチンの力価試験(ラット免疫原性試験)に用いるラット系統の検討

昨年度に引き続き実施した。セービンワクチンの力価試験では日本エスエルシー社のWistarラットが使用されているが、国内他機関の検討によりこの系統は真のWistarではなく、F344系統に遺伝的に近縁であることが示された。海外では不活化ポリオワクチンの力価試験には真のWistarラット(日本エスエルシー社のWistarラットが流通している可能性は極めて低い)が使用されており、データの比較ができないなど問題が生じかねない。そこで、日本チャールス・リバー社のWistarラットに参照不活化ポリオワクチン(セービン株)(国内参照品)を接種して中和抗体価測定を行ったところ、免疫応答に差異はあるものの、国内参照品の力価単位は2種のラットで大きな差異はないと結論した。

[染谷雄一、網康至(動物管理室)]

## 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

ア) レファレンスセンターとしてエンテロウイルス標準株と標準抗血清を保管し、要望に応じて地方衛生研究所等に

配付した。2017年度は、抗血清を6地衛研(49種類)、細胞を5地衛研(8種類)に配布した。

[吉田 弘, 有田峰太郎, 西村順裕, 清水博之]

#### イ) 手足口病検査を例とした外部精度評価(EQA)の導入研究

手足口病検査の施設間変動を明らかにする目的で外部精度管理調査を地方衛生研究所12施設の協力を得て試行的に実施した。その結果、CODEHOP-snPCR法によるウイルスRNA検出感度に施設間変動が認められ、使用する酵素等の反応諸条件の違いが影響しているものと判断された。これら反応条件と感度に関する施設間比較の結果を共有することにより、自施設の検査の質の改善に寄与すると考えられる。また試行の結果、市販の非感染性試料を用いることで他の疾患に対してもEQAをパッケージ化可能であることを示した。

[伊藤雅、皆川洋子(愛知県衛研)、板持雅恵(富山衛研)、小澤広規(横浜衛研)、木田浩司(岡山県環保セ)、北川和寛(福島県衛研)、佐野貴子、近藤真規子(神奈川県衛研)、高橋雅輝(岩手県環保研セ)、長谷川道弥、新開敬行(東京都健安研セ)、豊嶋千俊、山下育孝(愛媛県衛環研)、中田恵子(大安研)、西澤香織(熊本市環総セ)、峯岸俊貴(埼玉県衛研)、吉富秀亮、濱崎光宏(福岡県環保研)、吉田弘(感染研)]

#### ウ) 施設内における病原体等検査の質の管理手法導入の試みについて

感染症法改正により、地方衛生研究所において検査の質の確保が求められることとなり、標準作業書(SOP)など各種技術文書の整備が行われている。検査の質を確保するためには、効果的な監査システムの導入により施設内でPDCAサイクルを動かす必要がある。

一方、具体的な手法は各自自治体で各施設での状況に委ねられており、方法論の開発が必要である。今般QCツールの一つである、特性分析手法の導入を試み、検査の質の動機付け教育・研修及び管理手法を検討した。

[松岡由美子(熊本市環総セ)、吉田弘(感染研)]



(2) 不活化ポリオワクチン(IPV)導入後の環境水サーベイランス(5年目)によるポリオウイルスの監視

平成 29 年度は感染症流行予測調査事業として 16 か所、調査研究として 2 か所の計 18 か所の協力を得て流入下水中のポリオウイルスの有無を確認する環境水サーベイランスを実施した。18 か所の下水利用人口は、延べ約 660 万人である。本年度は調査期間中にポリオウイルスは検出されなかった。なおエコ-ウイルス 3 型、6 型が各々 14.13 か所で検出されており、全国レベルで不顕性感染者の存在が示唆された。国外では依然としてポリオ流行国が存在し、かつ生ワクチンを使用している国も多いため、引き続きポリオウイルスの監視を続けていく必要がある。

[板持雅恵(富山県衛研)、伊藤雅(愛知県衛研)、大沼正行(山梨県衛研)、小澤広規(横浜市衛研)、磯田美穂子(岡山県環境セ)、北川和寛(福島県衛研)、葛口剛(岐阜県環境研)、後藤明子(北海道衛研)、高橋雅輝(岩手県環境研)、筒井理華(青森県環境セ)、中田恵子(大安研)、中野守(奈良県環境研)、西澤佳奈子(長野県環境研)、濱島洋介(和歌山県環境研)、堀田千恵美(千葉県衛研)、諸石早苗(佐賀県環境セ)、三好龍也(堺市衛研)、吉富秀亮(福岡県環境研)、吉田弘(感染研)]

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

第 27 回ポリオ実験室診断技術研修会 (ポリオ及び麻疹風疹を含むワクチン予防可能疾患の世界的制御のための実験室診断技術としては第 8 回目) を実施した。感染研での研修期間は 2018 年 1 月 15 日～2 月 9 日、研修参加者は、アフガニスタンから 2 名、ナイジェリアから 2 名、フィリピン 2 名、スワジランド 1 名の計 7 名であった。WHO ワクチン予防可能疾患実験室ネットワークにおける国家実験室として必要な技術習得のための実習および講義を実施した。ポリオ根絶および麻しん・風疹排除の現状と技術的課題を中心とした講義および討議を行った。

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

(4) 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およびカンボジアの National Polio Laboratory として実験室診断を行った。本年度はカンボジア 107 検体およびラオス 486 検体の糞便からポリオウイルスの分離および同定を行った。ラオスの糞便検体からポリオウイルス 1 型 2 株、3 型 3 株が検出されたが、いずれも、ワクチン株(Sabin 株)と同定された。

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

イ) ラオスにおける 1 型ワクチン由来ポリオウイルスの流行

2015年9月7日に発症したAFP症例由来の糞便検体から1型ポリオウイルスが分離され、型内鑑別試験およびVP1領域の塩基配列解析により、分離株はSabin 1型との比較で3.3%の変異を有する1型VDPVと同定された。地域集団における1型VDPVの長期的伝播が示唆された。強化AFPサーベイランスに由来するポリオウイルス分離株の解析により、2015年9月から2016年1月にかけて発症した11例のAFP症例が、1型VDPVによるポリオ症例であることが明らかとなった。その後、2016、2017年度にラオスのAFP症例および接触者から分離されたポリオウイルスは、すべてワクチン株と同定され、1型VDPV伝播は終息したものと考えられる。また、2016年5月18日にAFP症例から採取した糞便からの検出以降、2型ポリオウイルスは検出されておらず、tOPV接種停止以降、ラオスでは2型VDPV伝播は認められていない。

[吉田 弘、有田峰太郎、西村順裕、Doan Hai Yen 和田純子、清水博之、Phengta Vongphrachanh, Bouaphanh Khamphongphane, Bounthanom Sengkeopraseuth (Laos EPI)、Walter William Schluter (WHO/WPRO), Siddhartha Sankar Datta (WHO/Laos)]

ウ) WHO/HQ および感染研国際協力室と協力し、2017年10月30日～11月1日に感染研戸山庁舎において開催された The 20<sup>th</sup> Polio Research Committee Meeting の開催準備および会議運営を担当した。日本における sIPV 開発・導入等に関する発表を行った。

[有田峰太郎清水博之、熊谷優子 (国際協力室)]

エ) 2017年9月25-28日に、WHO/WPRO(マニラ)で開催された「第7回西太平洋地域ワクチン予防可能疾患実験室ネットワーク会議」へ参加し、日本におけるポリオ根絶の確立と実験室診断の概要、等に関する情報提供を行った。

[清水博之]

オ) 2017年10月9日～10日に、NIBSC (Hertfordshire、イギリス) において開催された Meeting of the Ad Hoc Small Working Group on improving Polio Laboratory diagnostics に参加し、ポリオウイルス・バイオリスク管理に対応した実験室診断の現状と課題、等に関する技術的評価検討を行った。

[清水博之]

カ) 2018年3月11日～3月15日に WHO 本部において開催された Meeting of the Ad Hoc Small Working Group on improving Polio Laboratory diagnostics および The 24th Informal Consultation of the Global Polio Laboratory Network に参加し、ポリオウイルス病原体バイオリスク管理に対応した実験室診断、ポリオ根絶最終段階におけるサーベイランスの現状と課題等について技術的検討を行った。

[清水博之]

キ) 2018年4月23～24日に、台北で開催されたエンテロウイルス実験室診断実験室国際ワークショップに参加し、招聘講師として日本のエンテロウイルス感染症サーベイランスに関する講義を担当した。

[藤本嗣人(感染症疫学センター)、清水博之]

ク) 日本ポリオ根絶会議構成員として、Country Progress Report on Maintaining Polio-free Status in Japan for the 23<sup>th</sup> Regional Commission for the Certification of Poliomyelitis Eradication in the Western Pacific ドラフト作成と会議資料作成を担当した。

[清水博之]

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

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

[染谷雄一]

ケ) ポリオワクチン製造に関する WHO ガイドラインの更新作業

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

[染谷雄一]

2. WHO 西太平洋地域の 2017 年のポリオウイルス分離状況

(1) WHO 西太平洋地域のポリオウイルス分離状況

2017 年度にラオスおよびカンボジアから送付された AFP 症例および接触者由来の糞便検体 593 検体について、ウイルス分離検査及びポリオウイルスの型内株鑑別を行なった。

2015 年 9 月 7 日に発症した AFP 症例由来の糞便検体から 1 型ポリオウイルスが分離され、型内鑑別試験および VP1 領域の塩基配列解析により、分離株は Sabin 1 型との比較で 3.3% の変異を有する 1 型 VDPV と同定された。その後、広範な地域における AFP 症例および接触者の糞

便検体から、分子系統学的関連性を有する計 26 株の 1 型 VDPV が検出された。2017-2018 年にかけて、AFP 症例および接触者から 1 型 VDPV は検出されず、ラオスにおける 1 型 VDPV 伝播は終息したもの考えられる。

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

### 3. 世界ポリオ根絶計画に関わる研究

#### (1) 抗ピコルナウイルス化合物 MDL-860 の遺伝子発現に対する影響の解析

MDL-860 を細胞と 24 時間反応させることで、抗ポリオウイルス活性が顕著に上昇することを見出した。細胞の遺伝子発現への影響を解析したところ、MDL-860 は Nrf2-Keap1 抗酸化応答経路を活性化することが判明した。しかし、この経路の代表的な活性化剤として知られる sulforaphane は抗ポリオウイルス活性を全く示さなかった。これらの結果から、MDL-860 は親電子化合物であること、Nrf2-Keap1 経路の活性化は抗ポリオウイルス活性には必須ではないことが示唆された。

[有田峰太郎、Dobrikov G (Institute of Organic Chemistry with Centre of Phytochemistry, Bulgaria), Purstinger G (University of Innsbruck, Austria), Galabov AS (The Stephan Angeloff Institute of Microbiology, Bulgaria)]

#### (2) 抗ピコルナウイルス化合物 MDL-860 の *in vivo* における PI4KB 阻害機構の解析

MDL-860 の *in vivo* における PI4KB の影響を解析するために、細胞から PI4KB を精製して、その活性を測定した。その結果、MDL-860 処理細胞から精製した PI4KB は、未処理細胞からの PI4KB と比較して、活性が顕著に低下していることを発見した。精製 PI4KB の分子量を測定したところ、146 Da の分子修飾が生じていることが判明した。

[有田峰太郎、Dobrikov G (Institute of Organic Chemistry with Centre of Phytochemistry, Bulgaria), Purstinger G (University of Innsbruck, Austria), Galabov AS (The Stephan Angeloff Institute of Microbiology, Bulgaria)]

#### (3) 抗ピコルナウイルス化合物 MDL-860 の PI4KB 修飾部位の同定

MDL-860 は Nrf2-Keap1 経路を活性化することから、システイン残基との反応性を介して PI4KB 活性を低下させている可能性が考えられた。PI4KB の持つ 13 個のシステイン残基との反応性を測定した結果、646 番目のシステイン残基が MDL-860 と特異的に反応して PI4KB の活性を阻害することが判明した。646 番目のシステイン残基をセリンに置換した PI4KB を発現した細胞では、MDL-860 が抗ポリオウイルス活性を示さないことを見出した。これらの結果から、MDL-860 は PI4KB の 646 番目のシステインを特異的に修飾することで、不可逆的に細胞内の PI4KB を阻害し、抗ポリオウイルス効果を細胞に与えることが示唆された。

[有田峰太郎、Dobrikov G (Institute of Organic Chemistry with Centre of Phytochemistry, Bulgaria), Purstinger G (University of Innsbruck, Austria), Galabov AS (The Stephan Angeloff Institute of Microbiology, Bulgaria)]

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

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

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

(5)セービン IPV を抗原とした貼るワクチンの開発研究  
世界に先駆けて日本で独自開発され、2012年に定期接種に導入された弱毒化 Sabin 株由来不活化ポリオワクチン(sIPV) および国内で基盤技術開発が進められているマイクロニードル(MN)を用いた貼るワクチン(sIPV-NM)の開発を開始した。国内 sIPV をベースとした sIPV-MN ワクチンは、既存の注射ワクチンと比較して大きな利便性を有する新たなワクチン製剤として、途上国を含めた世界的ニーズが期待できる。製剤処方検討用に三価混合 sIPV 原液を濃縮し、Sabin 1～3 型の D 抗原量が目標値を達成していることを、D 抗原 ELISA により確認した。また、sIPV-NM 試作品において、現行注射製剤と同等の sIPV 抗原量を内包する事、十分な穿刺強度を持つ事、十分な皮内溶解性を有する事を確認した。MN の形状も検討し、ヒト投与に最適な形状の MN が作製可能出る事を確認した。sIPV-MN 製剤の有効性を確認するため、ラットを用いた有効性評価試験により、sIPV-MN 製剤最適化検討を進めている。また、よりヒトに近い動物モデルとして、カニクイザルモデルによる安全性・有効性評価試験の準備を進めた(感染研で実施予定)。非臨床試験(安全性薬理試験、同等性試験、毒性試験)を開始するため、ラット免疫原性試験およびカニクイザルにおける有効性試験で有効性・安全性を確認し、sIPV-MN 製剤処方を決定する予定である。

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

#### 4. 日本におけるポリオフリーの維持に関わる研究

##### (1) 不活化ポリオワクチン(四種混合ワクチン)累積接種率調査

我が国の定期接種の接種状況を把握する目的で、無作為に抽出した全国の満 2 歳児 5000 人と満 6 歳児 5000 人を対象として、Hib ワクチン、小児用肺炎球菌ワクチン、BCG ワクチン、四種混合ワクチン、水痘ワクチン、MR ワクチン(第1期、第2期)、日本脳炎ワクチンの累積接種率と経年変化を調査した。2017年調査の結果では、四種混合ワクチン 1 回目の累積接種率は 4 か月で 93.7%、追加接

種は 23 か月で 83.8%であった。IPV 含有四種混合ワクチンの接種状況はこの 3 年間で大きな変化はなく良好であるが、水痘、日本脳炎等、他の定期接種ワクチンも含めて勘案すると、ワクチン予防接種制度の変遷が予防接種に関する受療行動に与える影響が大きいことが示唆された。[崎山 弘(崎山小児科)、城 青衣(都立駒込病院)、梅本哲(医療産業研究所)、清水博之、大石和徳(感染症疫学センター)]

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

我が国ではポリオの定期接種に使用されるワクチンが 2012年に経口生ポリオワクチンから IPV に切り替わり、現在は 3 種類の IPV (cIPV、DPT-sIPV、DPT-cIPV) が使用可能である。IPV 導入から 6 年目の 2017 年度の調査結果によりポリオの予防接種状況・抗体保有状況の現況を検討するとともに、経年的な推移について検討を行った。2011～2017 年度調査の 5 歳未満児のうち、接種歴不明者を除く対象者についてポリオ含有ワクチンの 1 回以上接種率をみると、2011～2012 年度は 86～87%であったが、2013～2017 年度は 98～100%と高かった。接種ワクチンの種類・回数が明らかな者でみると、IPV のみ被接種者は 2011～2012 年度ほとんどみられなかったが、2013 年度 48%、2014 年度 73%、2015 年度 91%と増加し、2016～2017 年度は、97～99%が IPV のみ被接種者であった。一方、5 歳未満児の抗体保有率(中和抗体価 1:8 以上、以下同じ)についてみると、1 型・2 型に対しては 2011～2012 年度で 85～86%であったが、2013～2017 年度は 95～100%であり、1 回以上接種率の上昇にともない抗体保有率も上昇していた。3 型に対して 2011～2012 年度は 59～60%であったが、2013 年度 75%、2014 年度 88%、2015 年度 94%、2016 年度 96%、2017 年度 96%と抗体保有率の上昇がみられた。

[佐藤 弘、多屋馨子、大石和徳(感染症疫学センター)、清水博之]

##### (3) 不活化ポリオワクチン累積接種率調査

我が国の定期接種の接種状況を把握する目的で、無作

為に抽出した全国の満2歳児5000人と満6歳児5000人を対象として、Hib ワクチン、小児用肺炎球菌ワクチン、BCG ワクチン、四種混合ワクチン、水痘ワクチン、MR ワクチン(第1期、第2期)、日本脳炎ワクチンの累積接種率を調査した。2016年調査の結果では、四種混合ワクチン1回目の累積接種率は4か月で90.8%、追加接種は23か月で82.8%であった。個々のワクチンの接種状況はこの3年間で大きな変化はなく概ね良好であるが、予防接種制度の変遷が予防接種に関する受療行動に与える影響が大きいことが示唆された。

[崎山 弘(崎山小児科)、城 青衣(都立駒込病院)、梅本 哲(医療産業研究所)、清水博之、大石和徳(感染症疫学センター)]

#### (4) 日本人成人に対する不活化ポリオワクチン皮下注の免疫原性

以前、我々はIPVを個人輸入し、日本人成人にIPVを筋肉注射することにより、ポリオウイルスに対する中和抗体価が上昇することを確認した。2012年9月に、日本でも皮下注IPVが導入され、この製剤で日本人成人に追加接種を行う機会が多くなった。そのため、日本人成人に対してIPVを皮下注した場合の免疫原性の評価を実施した。健康成人を対象に、IPVを4週間間隔で2回皮下注した。ポリオウイルスに対する血清中和抗体価を計3回(ワクチン接種前、1回目接種の4週間後、2回目接種の4週間後)測定した。中和抗体価は、OPV株、強毒型標準株、さらに2型VDPV4株について測定した。健康成人12名のうち、OPV接種歴は、2回接種している者が9例、不明が3例であった。IPV接種前に中和抗体価8倍以上を保有する者は、OPV株のSabin1型で11名(91.7%)、Sabin2型で12名(100%)、Sabin3型で5名(41.7%)であった。また強毒型標準株のMahoneyで9名(75.0%)、MEF-1で12名(100%)、Saukettで1名(8.3%)であった。追加接種後の中和抗体価は、被験者全例で、全ての株に対し中和抗体価8倍以上となり、すべてのポリオウイルス株に対する中和抗体価は顕著に上昇した。IPV皮下注後の中和抗体価は、すべての血清型において、Sabin株とIPV抗原の材料である強毒株において大きな差異は認められなかった。また2型

VDPV株に対する中和抗体価も、Sabin2株に対する抗体価と同等であり、十分な発症予防効果を示すことが示唆された。

[福島慎二、濱田篤郎(東京医大)、清水博之、中野貴司(川崎医大)]

#### 5. 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) ヒトPSGL-1を発現するマウス細胞におけるマウスScarb2遺伝子のノックアウト

ヒトP-selectin glycoprotein ligand-1 (PSGL-1) およびヒトScavenger receptor class B member 2 (SCARB2)はエンテロウイルス71の受容体である。ヒトPSGL-1を発現させたマウスL929細胞(L-PSGL-1細胞)では、エンテロウイルス71がPSGL-1依存的に増殖するようになる。この感染過程にマウスScarb2分子が関与するかどうかを検討するために、CRISPR/Cas9システムを用いてマウスScarb2遺伝子のノックアウトし、L-PSGL-1[mScarb2-KO]細胞を樹立した。[西村順裕、清水博之]

##### (2) マウスScarb2をノックアウトしたヒトPSGL-1発現マウス細胞におけるEV71複製の解析

L-PSGL-1[mScarb2-KO]細胞におけるエンテロウイルス71の感染性を検討した。エンテロウイルス71がマウス細胞で増殖するためにはキャプシド蛋白質VP2の149番目のリジンがイソロイシンに変異することが必要であるため、この変異ウイルス(EV71-VP2-K149I)を用いて感染性を検討した。EV71-VP2-K149IはL-PSGL-1細胞に強い細胞死を誘導した。しかし、L-PSGL-1[mScarb2-KO]細胞には顕著な細胞死を起さなかつた。したがって、L-PSGL-1へのエンテロウイルス71感染過程において、マウスScarb2分子が関与していると考えられた。[西村順裕、清水博之]

##### (3) Fcタグを付加した可溶性PSGL-1蛋白質の作製

PSGL-1は膜貫通型の蛋白質であり、細胞外領域がエンテロウイルス71と相互作用する。この結合を詳細に解析するために、抗体定常領域(Fc)を付加した組換えキメラ

蛋白質の作製を試みた。PSGL-1 細胞外領域 cDNA をクローニングした Fc 配列付加発現プラスミドを、293T 細胞にトランスフェクションした。3 日目の細胞培養上清を回収し、組換え PSGL-1-Fc 蛋白質が分泌されていることをウエスタンブロッティングで確認した。[西村順裕、清水博之]

#### (4) 3xFLAG タグおよび His タグを付加した組換え SCARB2 分子の発現

SCARB2 とエンテロウイルス 71 の相互作用を詳細に解析するために、3xFLAG および His タグを付加した組換え SCARB2 分子の発現を試みた。SCARB2 は 2 回膜貫通型の蛋白質であり、その細胞外領域の C 末端に 3xFLAG タグおよび His タグを融合させた組換え蛋白質 (SCARB2-3xFLAG-His) の発現を試みた。SCARB2 の細胞外領域をコードする cDNA を、哺乳動物細胞分泌発現プラスミド pEF6-CpoI-3xFLAG-His の EF1a プロモーター下流にクローニングした。この発現プラスミドを 293T 細胞にトランスフェクションした。24 時間後に細胞を回収し、組換え SCARB2-3xFLAG-His 蛋白質の発現をウエスタンブロッティングで確認した。[西村順裕、清水博之]

#### (5) SCARB2 ペプチドに対するポリクローナル抗体の作製

SCARB2 の細胞内動態を詳細に解析するために、ペプチドを免疫原としたポリクローナル抗体の作製を試みた。ウサギを SCARB2 ペプチドで免疫した (ペプチド 2 種類、1 種類につき 2 羽を免疫)。抗体価の上昇を確認するために、免疫に使用したペプチドを固相化した ELISA を行った。4 羽のうち 3 羽のウサギは高い抗体価の上昇を示し、全血を採取した。この抗血清はフローサイトメトリーにおいても SCARB2 の発現検出に利用可能であった。[西村順裕、清水博之]

#### (6) 北部ベトナムにおける手足口病の疫学とウイルス遺伝子解析

ベトナムでは、近年、死亡例・重症例を含む手足口病あるいはエンテロウイルス 71 (EV71) 感染症の流行が報告さ

れている。2011-2012 年には、ベトナム全土で、死亡例を含む多くの重症例を伴う大規模な手足口病流行が発生し、公衆衛生上の大きな問題となっている。本研究では、ベトナム北部における手足口病症例由来検体からの病原体サーベイランスを実施し、EV71 分離株について、より詳細な分子疫学的解析を実施した。2017 年の北部ベトナムにおける手足口病症例 212 例のうち、191 例 (約 90%) がエンテロウイルス陽性と判定された。手足口病の主要な原因ウイルスは CV-A6 (42%) および CV-A16 (31%) であり、EV71 の検出頻度 (4.7%) は比較的 low だった。VP1 領域に基づく分子疫学的解析によると、2014-2017 年の北部ベトナムにおける主要な EV71 遺伝子型は subgenogroup B5 であった。2017 年に検出された EV71 株は、subgenogroup B5 の中で、3 種類の genetic lineage に分けられることが明らかとなった。ウイルス学的性状および病原性に直接影響する特徴的アミノ酸変異は認められなかったが、ウイルス学的性状を規定する重要なアミノ酸近傍に変異が認められた (VP1-95, VP1-96, VP1-146)。

[Tran Thi Nguyen Hoa, Nguyen Thi Hien Thanh (NIHE)、片岡周子 (北海道大学)、清水博之、]

#### (7) 2016-2017 年に北部ベトナムで検出された手足口病関連エンテロウイルスの解析

北部ベトナムにおける手足口病病原体サーベイランスを継続し、原因ウイルスの検出頻度と経年変化を解析した。2016-2017 年にかけて、従来、手足口病症例から高頻度に検出されていた EV71、コクサッキーウイルス A16 型 (CV-A16)、および A6 型 (CV-A6) ではなく、コクサッキーウイルス A10 型 (CV-A10) および A4 型 (CV-A4) が高頻度に検出された。CV-A10 および CV-A4 は、EV71 と比べると比較的 low 年齢の手足口病患者から検出される傾向が認められた。CV-A10 による手足口病は、広い範囲で認められたが、CV-A4 症例は、限局した地域で検出された。2017 年も含め、近年、ベトナム北部で重症エンテロウイルス感染症の報告が、ほとんど無い原因のひとつは、北部ベトナムにおいてコクサッキー A 群ウイルスが手足口病の主要な原因ウイルスとして定着したためと考えられる。今後、CV-A10 および CV-A4 による手足口病と、従来の原

因ウイルスによる手足口病口との疫学的な比較を継続する必要がある。

[Tran Thi Nguyen Hoa, Nguyen Thi Hien Thanh (NIHE)、中村朋史(阪大微研会)、片岡周子(北海道大学)、清水博之]

(8) エンテロウイルス71抗血清国際標準品樹立のための国際共同研究

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

[Gill Cooper, Javier Martin (NIBSC), 清水博之]

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

エンテロウイルス71カプシドタンパク質の*in silico*構造・多様性解析プラットフォームを構築し、カプシド安定性に寄与する高度保存アミノ酸残基を包括的に同定した。また、VP1-145等、EV71感染マウスとサルでの神経病原性発現に関わるカプシド変異の効果について*in silico*変異導入解析系を構築して解析し、VP1-145変異が変異箇所とは離れた位置にある領域が受容体結合表面やエピトープの構造を変えるアロステリック効果を発揮することを見出した。この変異により、ウイルスの細胞指向性、宿主受容体特異性、抗体感受性等が同時に変化し、病原性の発現につながる可能性が示唆された。

[小谷 治、佐藤裕徳(感染症ゲノム解析センター)、清水博之]

(10) カニクイザル EV71 感染モデルにおける VP1-145 アミノ酸変異の病原性への影響

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

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

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

EV-D68は *Enterovirus D* に分類され、ライノウイルス同様、温度感受性および酸耐性等のウイルス学的性状を有し、主として呼吸器感染症に関与するユニークなエンテロウイルスである。2014年、米国で、EV-D68感染症の広範な流行が発生し、呼吸器感染症だけでなく、急性弛緩性脊髄炎(Acute Flaccid Myelitis: AFM)・急性弛緩性麻痺(Acute Flaccid Paralysis: AFP)や脳神経障害等、中枢神経疾患合併症症例からEV-D68が検出されたことから、エンテロウイルスによる再興感染症として注目を集めた。日本でも、2015年8月以降、病原微生物検出情報におけるEV-D68検出数の顕著な増加が認められ、重症例を含む

呼吸器感染症由来検体からの EV-D68 検出事例が相次いで報告された。EV-D68 検出事例は、2015 年 9 月をピークに急増したが、EV-D68 感染症流行とはほぼ同時期に、小児を中心とした AFP/AFM 症例の報告が相次ぎ、一部症例から EV-D68 が検出された。積極的疫学調査の結果、55 人の小児および 4 人の成人(年齢の中央値、4.4 歳)を含む 59 例の AFM 症例が報告された。2015 年の AFM 流行曲線は、NESID の EV-D68 検出数の推移と強い相関を示したが、他の病原体検出パターンとの相関は認められなかった。EV-D68 は、鼻咽頭由来検体 5 例、糞便 2 例、CSF1 例、気管吸引、鼻咽頭および血清検体が 1 例から検出された。AFM 症例は多様な四肢麻痺を呈し、多くの症例で残存麻痺が認められた。症例報告、サーベイランス、検体採取や EV-D68 実験室診断の精度・感度等についても考慮する必要があるが、AFP/AFM を含む中枢神経疾患と EV-D68 感染の関連が強く示唆された。

[多屋馨子、花岡希、藤本嗣人(感染症疫学センター)、清水博之]

#### (12) 急性弛緩性麻痺サーベイランスと検査体制の整備

2018 年 5 月より、15 歳以下の急性弛緩性麻痺症例が、感染症法による 5 類感染症全数報告対象疾患となることから、急性弛緩性麻痺の病原体サーベイランスに関する国内外の現状を踏まえ、検査体制の整備を進めた。具体的には、「急性弛緩性麻痺を認める疾患のサーベイランス・診断・検査・治療に関する手引き」(厚労科研、多屋班)の作成に協力し、急性弛緩性麻痺 (AFP) サーベイランスとウイルス学的診断の項目の分担執筆を担当した。世界的 AFP サーベイランスの一環としてのポリオウイルス検査の位置付けと重要性、および EV-D68 を含む非ポリオエントロウイルス等の検査の概要について整理した。

[多屋馨子、藤本嗣人(感染症疫学センター)、清水博之]

#### (13) 我が国の病原体サーベイランスデータからみる EV-D68 検出症例

全国の地衛研において行われた病原体検査の結果が、感染症サーベイランスシステムの病原体検出情報に報告されている。病原体検出情報を基に EV-D68 感染症の流

行実態の把握を試みた。2000 年から 2015 年までに報告された EV-D68 検出例の年齢群、診断名等について特徴を調べた。2005 年以降、561 例の EV-D68 陽性例が報告された。2009 年までは年間に数例程度であったが、2010 年 129 例、2013 年 122 例、2015 年は 281 例の報告があった。EV-D68 感染症の流行規模は、年により大きく異なることが明らかとなった。どの年も 9 月をピークに夏から秋にかけて検出が増加しており、顕著な季節性が認められた。年齢中央値は 3 歳で、1 歳を中心に 0-4 歳群が最も多く、5-9 歳群が続いた。主な診断名は、下気道炎、上気道炎、気管支喘息など呼吸器疾患が大半であった。急性脳炎、心肺停止、急性弛緩性麻痺、末梢神経麻痺などの症例からの検出も報告されていた。EV-D68 を検出した検体の大多数は咽頭拭い液(約 80%)であったが、糞便、血液、等からの検出例の報告もあった。

[木下一美、有馬雄三、砂川富正、多屋馨子、大石和徳(感染症疫学センター)、清水博之]

#### (14) 乳飲みマウスによる EV-D68 型の分離

2015 年秋に、我が国で EV-D68 の大きな流行があり、急性弛緩性麻痺との関連が疑われたものの、未だ解明には至っていない。秋田県健康環境センターでは、感染症発生動向調査で収集された検体からのウイルス分離の一環として、乳飲みマウスへの接種を実施している。2015 年 8~10 月にかけて、喘息を主訴とする患者の咽頭拭い液を腹腔内に接種したところ、著明な弛緩性麻痺を呈する例が相次ぎ、最終的に 13 株を分離し、遺伝子解析および中和試験により EV-D68 と同定した。これらの株を飲みマウスに接種したところ、弛緩性麻痺が、前肢にまで及ぶことが観察された。今回分離した EV-D68 は、乳飲みマウスにおいて前肢にまで及ぶ弛緩性麻痺が再現的に観察できるという特徴がある。EV-D68 の病原性研究にとって、実験動物モデルが得られたことには重要な意義を持つ。

[斎藤博之、秋野和華子、佐藤寛子、藤谷陽子、柴田ちひろ、佐藤了悦(秋田県健康環境センター)、清水博之]

#### (15) EV-D68 感染マウスモデルの樹立とウイルス感染の解析



2015年に国内で分離されたEV-D68株の病原性を明らかにするための感染動物モデルを構築することを目的とした。秋田県において感染症発生动向調査で収集された呼吸器疾患患者の咽頭ぬぐい液のうち、新生仔マウスで分離されたEV-D68株を使用した。新生仔マウス分離後にヒト横紋筋肉腫由来RD-A細胞で1回増殖したものをストックウイルス液とした。臨床分離株を37℃培養条件下でH1-HeLa細胞にて継代したところ、効率よく増殖するウイルスを4株得ることができたが、そのうち1株が新生仔マウスにおいて神経病原性を維持していた。継代株を脳内接種した新生仔マウスの病理学的検査により、弛緩性麻痺を呈したマウスでは、脊髄におけるEV-D68感染に関連した神経細胞傷害を有することが明らかになった。EV-D68神経病原性発現に関連するウイルス側因子を探索するために必要な感染マウスモデルを樹立し、現在、ウイルス側の病原性規定因子の探索を進めている。[宮崎誠、永田典代(感染病理部)、斎藤博之、(秋田県健康環境センター)、Doan Hai Yen、清水博之]

#### (16) 次世代シーケンスによるEV-D68遺伝子解析

2015年に国内で検出されたEV-D68株を用いて、次世代シーケンス解析の条件検討を行った。培養細胞分離EV-68株、あるいは、新生仔マウス感染組織ホモジュネート検体からRNAを抽出し、次世代シーケンス解析を試みたところ、多くの検体において、特異的プライマーによる遺伝子増幅無しに、ランダムプライマーによる次世代シーケンスが可能であった。秋田県で呼吸器疾患患者から検出されたEV-D68株、および島根県で急性弛緩性麻痺を含む症例等から検出されたEV-D68株は、分子系統解析において、すべて2014年に米国で流行した遺伝子型Clade Bに属するが、中国、日本で2015年に検出されたEV-D68株との相同性が高かった。培養細胞(H1-HeLa細胞等)および感染マウスモデルにおけるEV-D68 capsid amino acid mutationの同定、in vitro および in vivo 継代過程でのamino acid mutationの解析のため、次世代シーケンスは有用であった。

[Doan Hai Yen、清水博之、斎藤博之(秋田県健康環境センター)、藤澤直輝(島根県保健環境科学研究所)、宮崎

誠、永田典代(感染病理部)]

#### (17) ICAM-5 持続発現細胞の作製

再興エンテロウイルス感染症の原因ウイルスとして近年注目を集めているEV-D68は、上気道上皮細胞に多く発現する糖蛋白質の $\alpha$ 2,6-結合シアル酸末端へ結合することにより、経気道感染すると考えられている。最近、シアル酸以外の新たなEV-D68宿主受容体として、神経細胞に特異的に発現するICAM-5/Telencephalinが同定されたが、神経細胞へのEV-D68感染および神経病原性発現におけるICAM-5の関与と機能は明らかにされていない。ICAM-5受容体を介したEV-D68感染機構を培養細胞レベルで解析するため、ICAM-5を発現していないVero細胞にヒトICAM-5遺伝子を導入し、ICAM-5を安定的に持続発現するVero細胞クローンの選択を進めている。

[Doan Hai Yen、西村順裕、清水博之]

#### (18) エンテロウイルス D68 感染増殖に関与する宿主因子の探索

宿主細胞内でのエンテロウイルスD68の生活環については不明な点が多い。まず、D68のFermon株、島根株、秋田株のヒト横紋筋肉腫由来細胞株RD-A、神経細胞(ヒト神経芽細胞腫SH-SY5Y、神経グリオーマ細胞腫U87-MG)への感染性を解析した。Fermon株は全ての細胞に感染し強い細胞障害(CP)を示したが、島根株、秋田株はRD-A、U87-MGでCPを示したが、SH-SY5YではCPが観察されなかった。そこでD68感受性細胞にCRISPR-Cas9 knockoutライブラリーを導入した。D68を感染させ、生存する細胞の遺伝子を、次世代シーケンサーを用いて解析し、D68増殖に重要な遺伝子を同定し、解析を進めている。

[相崎英樹、渡士幸一、鈴木亮介、清水博之]

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

深層学習の一種であるLSTM(Long Short Term Memory)モデルを用いて手足口病の流行規模の大きさとヘルパンギーナ流行発生時期を予測した。感染症発生动

向調査週報(IDWR)で公表されている統計データを学習させた結果、2014-2017年の手足口病の流行規模を予測できるLSTMモデルを作成できた。またヘルパンギーナでは2015-2017年の流行の開始期を予測できるLSTMモデルを作成できた。作成したLSTMモデルにより1ヶ月先の報告者数を予測することができた。

[吉田和央、清水博之]

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

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

[吉田和央、清水博之]

(21) コクサッキーウイルス B2 型感染マウスモデルの解析

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

[永田典代、岩田奈緒子(感染病理部)、Doan Hai Yen、清水博之]

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

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

2017年6月現在、1型野生株ポリオウイルス流行国は、

パキスタンおよびアフガニスタンに限局しており、WHO は、世界ポリオ根絶計画の早期達成を目指している。WHO Polio Eradication and Endgame Strategic Plan 2013-2018 では、世界ポリオ根絶達成の要件のひとつとして、ポリオウイルス取扱い施設から地域社会へのポリオウイルス再侵入のリスクを最小限とするための、ポリオウイルスの安全な取扱いと封じ込め活動の徹底を挙げている。そのため、WHO は、2014年12月に、ポリオウイルス病原体バイオリスク管理に関する世界的行動計画改訂第三版である WHO Global Action Plan to minimize poliovirus facility-associated risk after type-specific eradication of wild polioviruses and sequential cessation of OPV use(野生株ポリオウイルスの型特異的根絶および経口ポリオワクチン使用の段階的停止後におけるポリオウイルス取扱い施設関連リスクを最小化するための WHO 世界的行動計画; GAPIII)を公開し、ポリオウイルス病原体バイオリスク管理の厳格化を求めている。GAPIII は、ポリオ根絶最終段階におけるポリオウイルスのバイオリスク管理標準について、具体的かつ詳細に示した行動計画であり、世界中のポリオウイルス取扱い施設を、診断・研究・ワクチン製造等に関わる必須な機能を遂行するために必要とされる最小限の認証された施設(Essential Poliovirus Facility; PEF)に限定し、これらの施設では、GAPIII に示されたバイオリスク管理標準に準じてポリオウイルスを取扱うことを求めている。OPV 使用国で、2016年4~5月に実施された trivalent OPV 接種の世界的停止にともない、感染研でも不要な2型ポリオウイルス感染性材料を廃棄し、GAPIII に準拠したワクチン株(Sabin 2 株)を含む2型ポリオウイルス感染性材料のバイオリスク管理体制の整備、PEF 施設認証の準備を進めた。厚労省結核感染症課、日本ポリオ根絶会議等と協力して、WHO GAPIII によるポリオウイルス病原体バイオリスク管理体制整備に向けた周知と国内対応を進めた。

[清水博之]

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

ポリオ根絶最終段階に向けたポリオワクチン戦略の一環として、2016年4月のbivalent OPV導入後は、2型ワクチン株(Sabin2/OPV2株)についても、GAPIIIに基づく病原体管理の対象となる。不活化ポリオワクチン製造および品質管理を実施している国内施設では、PEF候補施設として、GAPIIIに対応したポリオウイルス・バイオリスク管理体制整備を進めている。そのため、国内PEF候補施設におけるバイオリスク管理標準について、技術的評価・検討を進めた。また、不活化ポリオワクチン品質管理において、出来る限り感染性ポリオウイルスを用いない手法を開発するため、sIPV抗原量測定のためのD抗原ELISA試験について、不活化抗原を用いる方法の技術的検討を進めた。IPV製造に関するWHOガイドライン(Guidelines for the safe production and quality control of poliomyelitis vaccine; Annex 2 of WHO Technical Report Series, No. 926)ドラフトについて、国内関連施設のコメントを集約し、WHO担当部署に提出した。

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

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

現在、PEF候補施設として感染性2型ポリオウイルスを取扱うことが出来るのは、ワクチン製造施設を除くと、国内では感染研村山庁舎のみである。これまで、感染症流行予測調査事業におけるポリオウイルス中和抗体価測定は地衛研で実施されてきたが、すべての地衛研で、2型ポリオウイルスを廃棄したことから、2017年度調査から、2型ポリオウイルス中和抗体価測定試験は、感染研ウイルス第二部で実施することとなった。地衛研で、従来通り、1型および3型ポリオウイルスに対する中和抗体価測定を実施し、残りの血清検体を感染研ウイルス第二部に送付し、2型中和抗体価測定を行った。今年度は、PEFにおける2型中和抗体価測定SOPを整備し、6地域からの約1400血清検体について、中和抗体価測定を実施し、結果を各地衛研に送付した。

[有田峰太郎、西村順裕、染谷雄一、清水博之]

(4)ポリオウイルスを含む可能性のある臨床検体・環境検体のバイオリスク管理  
糞便、咽頭拭い等の臨床検体および環境検体もポリオウイルス・バイオリスク管理の対象となることから、WHO-PIMガイダンス(Guidance for non-poliovirus facilities to minimize risk of sample collections potentially infectious for polioviruses)ドラフトを基にしたバイオリスク評価・管理手法の検討を行った。日本国内で下水中病原ウイルスモニタリングを行なっている研究所/研究室で保管しているPIMのRisk Group Levelは高くてもLevel 2 Lowであり、ガイダンスで求められるリスク低減策は、1)環境検体を用いる実験のRisk assessmentに関する規則、2)実験従事者ワクチン接種履歴の確認の2点であった。

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

### (5) WHO ポリオ実験室ネットワーク DVDを用いたバイオセーフティ教育訓練

WHOポリオ実験室教育訓練DVDは、実験室のバイオセーフティ、機器の維持管理、バイオセーフティ以外の実験室安全管理、実験室のアレンジメント等、実験室・検査室の運用・安全管理・教育訓練に関する具体的な事例が取り上げられており、病原体を取扱う実験室の安全管理の全体像を理解するうえで有用な教育訓練資料である。外国人研修生を対象としたJICA集団研修において、WHOバイオセーフティ教育訓練用DVDを用いたバイオセーフティ教育訓練を実施した。病原体送付方法に関する講義および実習を実施した。[伊木繁雄(バイオセーフティ管理室)、清水博之]

## III. 肝炎ウイルスに関する研究

### 1. A型肝炎ウイルス(HAV)に関する研究

#### (1) A型肝炎の発生動向調査

日本におけるA型肝炎の流行状況について、各地方衛生

研究所、保健所と共同で分子疫学的解析を行っている。6月に長野県で発生した調理従事者を介した食中毒事例について、原因となった株は遺伝子型 IA であり、調理従事者が喫食した中国産冷凍殻付きアサリが当該株に汚染されていた可能性が示唆された。さらに、急性 A 型肝炎の集団食中毒事例が 2018 年 1 月に宮崎県で発生したが、分子疫学的解析の結果、原因となった株が長野県と同一であることが明らかとなった。その後の調査で、原因食材が同じ産地の殻付き冷凍アサリであることが判明した。

[石井孝司, 塚田竜介(長野県環境保全研究所), 有馬茉莉\*, 井上志穂\*, 松浦裕\*, 三浦美穂\*(宮崎県衛生環境研究所), 清原知子, 吉崎佐矢香, 佐藤知子, 村松正道]

## (2) A型肝炎の血清疫学調査

直近の A 型肝炎の流行状況を把握するため、全国規模の血清疫学調査を実施した。日本赤十字社の献血者血清(7000 検体, 2017 年採血)と国立感染症研究所血清銀行保存血清(867 検体, 2013-2015 年採血), 合計 7867 検体の抗 HAV 抗体を測定した。陽性は 221 検体, 人口で補正した抗体陽性率は約 20%であった。年齢分布を見ると, 60 歳未満の抗体陽性率は 0.4%であった。以上の結果から, 国民の 80%, 中でも 60 歳未満のほぼ 100%は HAV 感受性者と考えられる。

[清原知子, 石井孝司, 村松正道]

## (3) 参照 A 型肝炎ワクチンの更新

参照 A 型肝炎ワクチンのロット更新のため, 次期参照ワクチン候補品の値付けを実施した。当室と製造所の 2 施設で力価試験 (*in vivo*, *in vitro*) をそれぞれ 3 回繰り返し, 各試験 6 回分のデータを統計解析して値を決定した。現行参照ワクチン Lot. P2 に対する候補品の *in vivo*, *in vitro* 相対力価はそれぞれ 2.3 参照単位/vial, 1.149 参照単位/vial であった。この候補品を次期参照 A 型肝炎ワクチン Lot. P3 として業務委員会と検定協議会に報告, 承認された(平成 29 年 12 月 7 日)。

[清原知子, 佐藤知子, 李天成, 吉崎佐矢香, 石井孝司, 落合雅樹(品質保証・管理部), 村松正道]

## (4) フィリピンの河川水から HAV 遺伝子の検出

フィリピンは A 型肝炎ウイルス (HAV) の流行国であるが、疫学に関する情報が少ない。フィリピンにおける環境水の HAV 汚染状況を把握するために、我々は、川水からサンプルを採集し HAV RNA の検査を試みた。2012~2013 年にかけてマニラ市内を流れた川の 6 つの採集ポイントからそれぞれ乾季と雨期に合計 12 個のサンプルは採取した。乾期に採取した 6 つのサンプルと雨期の 1 つのサンプルから HAV RNA が検出された。遺伝子型は IA と IIIA である。以上の結果からフィリピンの河川水に HAV の汚染があり、少なくとも 2 つの遺伝子型がこの地域に存在していることが明らかになった。

[白慧敏, 塩田智之, 吉崎佐矢香, \*斉藤麻理子, \*押谷仁, 武田直和, 脇田隆宇, 石井孝司, 村松正道, 李天成 (\*東北大学, \*\*大阪大学微生物病研究所)

## 2. B型肝炎ウイルス(HBV)に関する研究

### (1) B型肝炎流行予測調査

B型肝炎ワクチンの定期接種に伴い B型肝炎の流行予測調査が開始された。当室では調査実施機関(2 自治体)の技術支援を担当している。今年度は行政検査 1 件 17 検体について対応した。

流行予測調査の結果, 0-4 歳児において HBs 抗体陽性率の増加が認められた。2015 年, 2016 年, 2017 年の順に 15.8%, 58.0%, 78.8%で, 2017 年は, 定期接種対象年齢である 0, 1 歳においてそれぞれ 100%, 90%と高い陽性率を示し, 定期接種による防御抗体賦与効果が明らかとなった。

[清原知子, 石井孝司, 村松正道]

### (2) B型肝炎ウイルス L タンパク質の免疫原性確認(マウス)

B型肝炎ウイルス表面抗原 (HBsAg), PreS1, PreS2, S タンパク質を含む L タンパク質粒子(ビークル社)をアルミニウムアジュバントと混和してマウスに免疫し, L タンパク質抗血清を得た。この抗血清は免疫源である L タンパク質にはよく反応するが, L タンパク質の一部である PreS1 ペプ

チド、組換えSタンパク質との反応は比較的弱く、PreS2ペプチドには反応しなかった。市販のB型肝炎ワクチン(HBsAg-Sタンパク質のみ含有)抗血清と比較すると、Sタンパク質との反応は弱く、今回使用したLタンパク質粒子のHBs抗体誘導能は低いと考えられた。

[清原知子, 石井孝司, 加藤孝宣, 村松正道]

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

[Que Lusheng, 喜多村晃一(金沢大学), 若江亨祥, 村松正道]

#### (4) 首都圏におけるB型急性肝炎の疫学調査

1994年から2017年の首都圏におけるB型急性肝炎(AH-B)の発生动向について検討を行った。24年間の観察期間においてAH-Bの患者総数は246例であった。観察開始以降、AH-B症例数は増加傾向となり2004年に年間19例に達し2010年までほぼ横ばいで経過した。以降は減少に転じ2014年以降は年間5例前後で経過した。Genotype(GT)の分布は2002年からGTAの増加を認め、2006-2009年はGTAが70%以上を占めた。その後一時、GTAが減少、GTCが増加し本邦ではまれなGTE、GTHもみられた。2014年以降は再びGTAが70%以上となった。従って2006年以降は常にGTAが優位であった。

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

#### (5) B型急性肝炎患者背景の調査

B型急性肝炎(AH-B)246例の患者背景、臨床検査値について調査を行った。全症例の平均年齢は31.8 ± 9.3歳、

男性83.7%(206/246)、感染経路は性感染が79.3%(195/246)であった。性感染のうち男性間性交渉者(MSM: Men who have Sex with Men)が26.7%(52/195)、異性間が73.3%(143/195)であった。検査し得た106例中6例(5.7%)でHIV抗体陽性であった。genotype(GT)別の比較では年齢に有意な差はなく、男性はGTAでは96.4%と大多数を占めMSMは41.5%でありGTB、Cと比較し有意に多かった。臨床検査値ではGTAはGTCと比較しALTのピーク値が低く、HBV DNAのピーク値が高値であった。HBs抗原陽性期間はGTAがGTB、Cと比較し有意に長かった。

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

#### (6) B型急性肝炎からの慢性化例の検討

B型急性肝炎から慢性化した5症例(GTA;3例, GTC;1例, GTH;1例)の検討を行った。5症例の平均年齢は33.2 ± 9.2歳、男性4例、女性1例であった。感染経路は4例が性感染であったが、その様式はMSM、特定の異性間、不特定の異性間とさまざまであった。HIV抗体は全例陰性であった。臨床検査値では初診時のHBe抗原は全例陽性であり、HBV DNAのピーク値は高値であるがALT、T-Bilのピーク値が低い傾向がみられた。HBV全長の塩基配列の解析では、いずれの症例もPreCore領域、Core Promoter領域、kozak配列に変異は認めず、慢性化に関与すると考えられる5症例に共通したアミノ酸変異はみられなかった。

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

#### (7) B型急性肝炎症例のa determinant領域のアミノ酸変異の検討

B型急性肝炎106例(GTA;72例, GTB;15例, GTC;19例)からHBV DNAを抽出しHBs抗原領域の塩基配列を決定した。得られたアミノ酸配列をそれぞれのGTのコンセンサス配列と比較した。a determinant領域(aa 124 - 147)に変異を有する症例は7例であり、内訳はGTA;3例(F134Y, P135H, G145A), GTB;2例(T126S, M133L),

GTC;2例(T131A, T131P)であった。ワクチンエスケープ変異として知られる変異はG145A(GTA), T126S(GTB)の2例で検出された。最も強力なワクチンエスケープ変異として知られているG145R変異は検出されなかった。a determinant領域にアミノ酸変異を有する症例とそれ以外の症例で各種臨床検査値に有意な差は見られなかった。[山田典栄, 安田清美(清川病院), 奥瀬千晃(川崎市立多摩病院), 渡邊綱正(聖マリアンナ医科大学), 加藤孝宣]

#### (8) IFN- $\lambda$ 3のHBウイルス関連蛋白合成阻害に関する検討

培養細胞でのHBV複製モデルを用いて、IFN- $\lambda$ 3による抗ウイルス作用の評価を行った。1.38倍長のHBVコンストラクトを培養細胞に導入しIFN- $\lambda$ 3, IFN- $\alpha$ を添加し、培養上清と細胞中のHBsAgおよびHBcrAgを測定することでIFN- $\lambda$ 3によるHBウイルス関連蛋白に与える影響を検討した。培養上清、細胞内ともにIFN- $\lambda$ 3濃度依存的にHBsAg, HBcrAgが低下した。同様の系を用いて培養し細胞内のCore蛋白結合HBV DNAを測定した。Core蛋白結合HBV DNA量はIFN- $\lambda$ 3濃度依存的に低下し、新規ウイルス粒子の産生が抑制されていると考えられた。さらにIFN- $\lambda$ 3処理後の細胞内HBV RNA量はIFN- $\lambda$ 3の濃度依存的に低下した。これによりIFN- $\lambda$ 3による抗HBV作用は転写抑制によるものと考えられた。

[山田典栄, 村田一素(国際医療福祉大学), 加藤孝宣]

#### (9) IFN- $\lambda$ 3によるHBV感染およびcccDNAに与える影響についての検討

HBV感染感受性HepG2-NTCP細胞にHepG2.2.15細胞由来HBVを感染させ、IFN- $\lambda$ 3, IFN- $\alpha$ を添加した後にHBc抗体で染色し感染細胞数の評価を行った。その結果、IFN- $\alpha$ 添加において明らかな感染細胞数の低下を認め、IFN- $\lambda$ 3の添加では濃度依存的に感染細胞数の低下を認め、高濃度ではIFN- $\alpha$ と同程度の感染阻害が確認された。同様の系を用いてcccDNA合成についても評価を行い、cccDNA量がIFN- $\lambda$ 3濃度依存的に低下することを確認した。

[山田典栄, 村田一素(国際医療福祉大学), 加藤孝宣]

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

HepG2細胞をIFN- $\lambda$ 3, IFN- $\alpha$ で処理し発現誘導されるISGのmRNAを測定した、またHBV複製モデルコンストラクトを導入後に同様の検討を行った。IFN $\lambda$ 3投与においてIFN $\alpha$ の誘導は見られず、IFN $\lambda$ 3の作用はIFN $\alpha$ を介したのではないと考えられた。IFN- $\lambda$ 3, IFN- $\alpha$ の投与において複数のISGの誘導が認められた。特にViperin, IFI6, IFITM3において顕著な誘導が見られた。これらの誘導はIFN- $\lambda$ 3とIFN- $\alpha$ の両方で認められIFN- $\lambda$ 3のみで誘導される特徴的なISGは認めなかった。さらにこれらのISG誘導はHBV複製モデルコンストラクトの導入により影響を受けなかった。誘導されたISGの中にはウイルス排除に関わると報告されているISGがあり、IFN- $\lambda$ 3においてもこれら複数のISGが抗HBV作用に関与している可能性が示唆された。

[山田典栄, 村田一素(国際医療福祉大学), 加藤孝宣]

#### (11) HBV複製モデルコンストラクト導入による感染性ウイルス粒子産生の検討

HBVのレセプターであるNTCPの発見により、この因子を発現させた培養細胞へのHBVの感染が観察できるようになった。しかし現状では培養細胞への感染が観察できるのはHepG2.2.15細胞等で作製された遺伝子型D株のみである。そこでHBV複製モデルコンストラクトを培養細胞に導入することで感染性粒子の作製を試みた。遺伝子型C株のHBV複製モデルコンストラクトをHepG2細胞に導入し、得られた培養上清を密度勾配超遠心で精製し、NTCP発現HepG2細胞に感染させることによりその感染が確認できた。

[加藤孝宣, 村山麻子, 山田典栄, 大崎由喜]

#### (12) HBV粒子精製方法の検討

培養細胞で作製したHBV粒子の精製方法について検討を行った。HBV遺伝子型C株の複製モデルコンストラクトをHepG2細胞に導入し、HBV粒子を含む培養上清を得た。得られた培養上清に感染性粒子が含まれているこ

とを、NTCP を発現する HepG2 細胞に感染させて確認した。この粒子を含む培養上清をヘパリンカラムで精製し、夾雑タンパク質を除去した。さらに精製した培養上清を密度勾配超遠心で2回精製し、さらなる夾雑タンパク質の除去と濃縮を行った。

[加藤孝宣, 村山麻子, 山田典栄, 大崎由喜]

#### (13) HBs 抗原検出用体外診断薬の絶対評価のための FLAG 付加 HBs 蛋白質の精製

HBs 抗原検出用体外診断薬の絶対評価のための精製 HBs タンパク質の作製を試みた。精製のために FLAG タグを付加した様々なウイルス株の HBs タンパク質を培養細胞で発現させ、細胞破砕液に含まれる HBs タンパク質をアフィニティーカラムにより精製した。しかしながら溶出に使用した FLAG ペプチドを完全に除去することができず、精製度の高い FLAG 付加 HBs タンパク質は得られなかった。

[村山麻子, 加藤孝宣, 百瀬暖佳(血液・安全性研究部), 松岡佐保子(血液・安全性研究部), 浜口功(血液・安全性研究部)]

#### (14) 微小管依存的な HBV キャプシド形成機構の解明

微小管合成阻害剤ノコダゾールを HBV 複製細胞へ処理することで、HBV 複製の特にキャプシド形成過程が阻害された。HBV 複製細胞ではキャプシド形成の原料となるコアタンパク質と微小管構成因子チューブリンとの相互作用が観察された一方で、ノコダゾール処理によりこれら相互作用が低下した。コアタンパク質とチューブリンの相互作用が強い細胞は効率的なキャプシド形成および HBV 複製能を有する事を明らかにした。

[岩本将士, Haitao Guo(インディアナ大), 脇田隆宇, 渡士幸一]

#### (15) HBV 粒子を標的とする HBV 侵入阻害剤の解析

これまでにプロアントシアニジンが HBV の preS1 領域との相互作用を介して HBV 粒子を直接標的とするため、NTCP 依存的胆汁酸の取り込み機能を阻害することなく HBV 感染を低下させることを見出した。そこで100化合物

以上のプロアントシアニジンの類縁体および天然由来ポリフェノール類の抗 HBV 効果を解析し、より強い活性を有する化合物を得た。また構造活性相関解析により、HBV 粒子との結合に関与する構造を同定した。

[九十田千子, 渡士幸一, 田中義正(長崎大学), 朴三用(横浜市立大), 齊藤重貴子(大阪電通大), 脇田隆宇]

#### (16) NTCPを標的とした HBV 侵入阻害化合物の同定

化合物アレイにより NTCP に結合する低分子化合物をスクリーニングし、74 のヒット化合物を得た。これらのうち NPD8716 は HepG2-hNTCP-C4 細胞およびヒト初代肝細胞への HBV 感染を低濃度で阻害した。構造活性相関解析によって、NPD8716 およびその誘導体の抗 HBV 活性は NTCP への親和性と NTCP 依存的胆汁酸輸送活性に相関することが示された。

[金子学, 渡士幸一, 九十田千子, 二村友史(理研 CSRS), 近藤恭光(理研 CSRS), 長田裕之(理研 CSRS), 朴三用(横浜市立大), 松永智子(横浜市立大), 梁明秀(横浜市立大), 脇田隆宇]

#### (17) RaPID システムを用いた HBV 感染阻害環状ペプチドの同定

NTCP と相互作用する特殊環状ペプチドを RaPID スクリーニングシステムにより 10 種同定し、そのすべてが HBV 感染阻害活性を示した。中でも活性の高い3種のペプチドは NTCP の胆汁酸取り込み機能を低下させなかったため、NTCP が有するトランスポーター機能と HBV のレセプター機能は分離可能であることが示唆された。

[深野顕人, 渡士幸一, Toby Passioura(東京大), 志村聡美, 梁明秀(横浜市立大), 菅裕明(東京大), 脇田隆宇]

#### (18) B 型肝炎ウイルスの適応進化メカニズム解析

sodium taurocholate cotransporting polypeptide(NTCP) は肝臓での胆汁酸取り込み輸送体であるとともに、ヒトに感染する B 型肝炎ウイルス(HBV) の感染受容体としても機能する。この NTCP の配列が種の進化の過程でどのように変化し、ウイルス受容体としての機能が保存あるいは変化してきたかに関しては全く解析されていない。本研究で

は NTCP を系統的に解析することで、種の進化上での NTCP 配列保存性と宿主種間での HBV 感染感受性の違いを決定している NTCP 部位を同定した。以上の結果は、ヘパドナウイルス感染の NTCP 依存性とその宿主域決定における役割を理解するために重要な知見である。

[竹内(柴田)潤子, 村松正道, 渡士幸一]

#### (19) 抗ウイルス薬の標的候補分子の同定

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

[木下渉(JT 医総研), 渡士幸一, 脇田隆字]

#### (20) B型肝炎流行予測調査のサポート業務

B型肝炎ワクチンの定期接種化に伴い、B型肝炎の流行予測調査が開始された。この調査は HBs 抗原、HBc 抗体、HBs 抗体の試験を含み、各検体の試験結果を複合的に判断して、ワクチンの実施状況、効果を評価することを目的とする。

当室では実施機関からの技術的質問および確認検査に対応する。他の VPD 疾患と異なり、調査の過程において被験者の B型肝炎感染が判明する可能性も考えられ、デリケートな対応が求められる。現在の B型肝炎流行予測調査実施機関は 2 自治体である。これまでに応じたサポート業務は以下の通りである。

- ・抗 HBs 抗体価の算出方法
- ・HBs 抗原陽性及び/あるいは HBc 抗体陽性検体の確認試験
- ・試験結果の解釈
- ・結果を被験者に知らせる際の説明内容の作製(科学的

な部分)

[清原知子、石井孝司、脇田隆字]

#### (21) B型肝炎ワクチン *in vitro* 試験 (継続)

B型肝炎ワクチンは各製造所によって、HBs 抗原発現宿主細胞、HBs 抗原のサブタイプ、アジュバントの種類、製造方法などが異なる。*In vitro* 試験はこれらの差に影響されるため、*in vivo* 試験のように全製造所のワクチンを一律に比較することは困難である。しかしながら、*in vivo* 試験の結果を基に、各製造所で固有のリファレンスワクチン(ワーキングリファレンス)を設定すれば、製造ワクチンの抗原性の consistency が確認できる。今年度は B型肝炎ワクチン「ヘプタバックス II」の複数ロットについて *in vitro* 相対力価を測定し、一貫性の確認を行った。同一原液から作製された一連のロットは *in vitro* 相対力価が近似値を示した。今後、原液が異なるロットについても検討を進める。

現行の *In vitro* ELISA キットに続く次代キットのために、抗 HBs 抗血清(ウサギ)を作製した。現在使用している抗 HBs 抗血清(羊)に比べて抗体価が低かったため、IgG を精製し、固相化 HBs 抗体としての使用を検討する。

[清原知子、石井孝司、脇田隆字]

#### (22) 本邦における急性 B型肝炎のサーベイランス

感染症法に基づくサーベイランス事業で、1999 年から 2015 年間の 16 年間の急性 B型肝炎の発生動向を調べ報告した。急性 B型肝炎の発生は 2010 年ころから約 50 症例以下に抑制されていた。全国の県別の発生報告では東京都のみ増加傾向にあった。

[Zheng Xin, 相崎英樹, 高橋琢理, 砂川富正, 大石和徳(感染症疫学センター)、田中純子(広島大)、脇田隆字]

#### (23) B型肝炎ウイルス(HBV) preS1 領域に対する抗体の誘導

HBV の NTCP への結合に重要な preS1(2-47aa)の抗原性および中和エピトープの解析を行う目的で、preS1(2-47aa)領域に対するマウスモノクローナル抗体の作製を試みた。preS1(2-47aa)領域を様々な形態で発現する計 5 種類のプラスミドを BALB/c マウスに DNA 免疫し、



その血清を評価したところ、抗 preS1 抗体の誘導が認められた。そのうち大腸菌のシャペロン由来分子アジュバントである GroEL と融合した preS1 および HBV Large S を免疫したマウス血清においてより強い HBV 感染中和活性が認められた。今後はそれらマウスからモノクローナル抗体を得ることで HBV 中和抗体のエピトープ解析を行う。

[矢藤慶悟, 小野寺大志(免疫部), 松田麻未, 藤本陽(北里大), 森石恆司(山梨大), 高橋宜聖(免疫部), 田村浩二(東京理科大), 加藤孝宣, 村松正道, 鈴木亮介]

#### (24) IL-1 $\beta$ /ATF3-mediated induction of Ski2 expression enhances Hepatitis B Virus x mRNA degradation

We previously showed that HBx mRNA is degraded by the Ski2/RNA exosome complex. We analyzed the regulation of this system through the control of Ski2 expression. We identified IL-1 $\beta$  as an inducer of expression from the Ski2 promoter. IL-1 $\beta$  induced the expression of ATF3 transcription factor, which in turn binds to cyclic AMP-responsive element sequence in the Ski2 promoter and is responsible for Ski2 promoter induction by IL-1 $\beta$ . Finally, we showed that HBx mRNA is degraded in response to IL-1 $\beta$  treatment. We are working now to design anti-HBV drugs by screening for ATF3 agonists that can suppress HBV replication.

[Hussein H Aly, Fumihito Shiromoto, Takanobu Kato, Takaji Wakita]

#### (25) HBV regulation of Ski2 expression

We also analyzed a possible effect of HBV on Ski2 expression and activity. Interestingly, HBx also significantly induced Ski2 expression. To our knowledge, this is the first report to show activation of the Ski2/RNA exosome complex by both the host and HBV. Understanding the regulation of the Ski2/RNA exosome system is expected to facilitate prevention of HBx-mediated complications through targeting the posttranscriptional degradation of HBx mRNA; and will

also help shedding a light on the role of RNA decay systems in inflammation.

[Hussein H Aly, Fumihito Shiromoto, Takanobu Kato, Takaji Wakita]

#### (26) Polymerase Gamma regulation of HBV life cycle

We found that polymerase gamma PolG1 is required for HBV replication in HepG2 and Huh-7 cells. siRNA suppression of PolG1 also inhibited HBV infection in HepG2-NTCP. We are performing mechanistic analysis to identify the mechanisms by which PolG1 affect HBV life cycle.

[Hussein H Aly, Fumihito Shiromoto, Takanobu Kato, Takaji Wakita]

#### (27) Screening for host factors affecting HBV life cycle

Using a druggable siRNA library targeting around 9000 human genes, we are aiming to identify and analyze the mechanisms by which host factors interact with HBV life cycle. Based on these data we are planning to design anti-HBV therapeutics.

[Hussein H Aly, Fumihito Shiromoto, Takanobu Kato, Takaji Wakita]

#### (28) RaPID システムを用いた HBV 感染阻害環状ペプチドの同定

NTCP と相互作用する特殊環状ペプチドを RaPID スクリーニングシステムにより 10 種同定し、そのすべてが HBV 感染阻害活性を示した。中でも活性の高い3種のペプチドは NTCP の胆汁酸取込み機能を低下させなかったため、NTCP が有するトランスポーター機能と HBV のレセプター機能は分離可能であることが示唆された。

[深野顕人, 渡士幸一, Toby Passioura(東京大), 志村聡美, 梁明秀(横浜市立大), 菅裕明(東京大), 脇田隆宇]

#### (29) AlphaScreen 法を用いた B 型肝炎ウイルス侵入阻害剤の同定

AlphaScreen 法を用いた 1,500 化合物のスクリーニングより、

LHBs-NTCP 相互作用の阻害効果が最も高いものの一つとしてラパマイシンを同定した。ラパマイシンは NTCP に直接結合することで HBV 感染を阻害することが示された。さらにラパマイシンより高い阻害効果を持つ誘導体を同定した。

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

(30) Regulation of Ski2/RNA exosome system to suppress HBV-X mRNA.

We have shown the mechanism by which the Ski2/RNA exosome system target HBV-X mRNA for degradation. Since HBV-X is required for HBV-infectivity, regulating its degradation, and subsequently, its expression levels can be used to suppress HBV. We focused on the analysis of the transcription regulation of Ski2 as an important component of the Ski2/RNA exosome system. We constructed Ski2 promoter and we are analyzing the transcription factors required for its induction.

[Hussein H Aly, Fumihiko Shiromoto, Takanobu Kato, Takaji Wakita]

(31) Cytokine Screening for Ski2 regulation.

Since Ski2 antagonized HBV-replication, we hypothesized it has an anti-viral role, and analyzed its induction during inflammation. We identified IL-1b inflammatory cytokine to be a major inducer of Ski2 expression in both HepG2, and Primary Hepatocytes, suggesting its induction and the activation of Ski2/RNA exosome system in inflammation. We further demonstrated the degradation of HBV-X mRNA mediated by IL-1b treatment. The signaling mechanism by which IL-1b can induce Ski2 expression is under investigation.

[Hussein H Aly, Fumihiko Shiromoto, Takanobu Kato, Takaji Wakita]

(32) The role of exosomes released from HBV infected

cells on Kupffer cells function.

We aimed to purify exosomes released from HBV-infected cells, and analyze HBV-induced changes in its contents, and its possible effect on the function of Kupffer cells, the major subset of hepatic macrophages, compared to non-infected cells. We successfully purified the exosomes secreted from the supernatants of HBV-infected and control cells, and sent the specimen for spectrometry and RNA seq analysis to identify possible changes in its cargo. We are in the process of validation and confirmation of the results obtained.

[Hussein H Aly, Takanobu Kato, Takaji Wakita]

### 3. C型肝炎ウイルス(HCV)に関する研究

#### (1) ビタミン D 誘導体の抗 HCV 活性

ビタミン D 前駆体の一つである 25ヒドロキシビタミン D3 には抗 HCV 作用があることが知られている。その作用機序を解明するために、VDR 結合能と転写活性化能が既知のビタミン D 誘導体ライブラリーから抗 HCV 活性を持つ誘導体を同定した。さらにこれらの薬剤は細胞内での感染性ウイルス産生を特異的に阻害していることを明らかにした。

[村山麻子, 脇田隆字, 加藤孝宣]

#### (2) アポリポ蛋白質の発現抑制が HCV 増殖に及ぼす影響の解析

抗 HCV 活性を示すビタミン D 誘導体はアポリポ蛋白質の発現を抑制していた。そこで、アポリポ蛋白質の発現抑制がウイルス増殖に与える影響を調べた。その結果、アポ A1, アポ C3 の発現を siRNA により抑制すると、細胞内、培地中の HCV コア抗原量および感染性ウイルス粒子量が減少したことから、ビタミン D 誘導体によりアポリポ蛋白質が減少することにより HCV 増殖が阻害されると考えられた。

[村山麻子, 脇田隆字, 加藤孝宣]

#### (3) 第二世代 NS5A 阻害剤の遺伝子型 2a の HCV に対す

る薬剤耐性変異の検討

第二世代のNS5A阻害剤の存在下で遺伝子型2aのJ6ccウイルスの感染細胞の長期培養を行い、得られた耐性ウイルスを解析した。耐性ウイルスの変異は day33 では F28C と F28S が混在しており、day48 では F28S のみとなった。これらの変異を J6cc 株に導入すると、F28C 変異はウイルスの複製には影響がなく、EC50 値を約 10 倍に上昇させ、一方 F28S 変異はウイルスの複製を約 1/4 に低下させるものの、EC50 値を約 100 倍に上昇させた。

[村山麻子, Mingjun Huang (Achillion), 脇田隆宇, 加藤孝宣]

(4) 第二世代 NS5A 阻害剤の遺伝子型 2b の HCV に対する薬剤耐性変異の検討

第二世代の NS5A 阻害剤の存在下で遺伝子型 2b の J8ccウイルスの感染細胞の長期培養を行い、得られた耐性ウイルスを解析した。耐性ウイルスの変異は day48 では C92R と Y93H が混在していた。これらの変異を J8cc 株に導入すると、ウイルスの複製には影響はなかったが、EC50 値を 100 倍以上に上昇させた。

[村山麻子, Mingjun Huang (Achillion), 脇田隆宇, 加藤孝宣]

(5) 新規 NS5A 阻害剤耐性変異が HCV ライフサイクルに与える影響の解析

NS5A 阻害剤に対する耐性変異である P32 欠損は DCV に対する強い耐性が知られており、DAA 治療不成功例での検出が報告されている。そこで NS5A 領域を 1b 株に置換した JFH-1 株を用いて、P32 欠損を導入したキメラウイルスを作製し HCV ライフサイクルに与える影響の評価を行った。その結果、P32 欠損の導入により培養上清および細胞内のコア抗原量は低下し、この変異は HCV の複製能を低下させると考えられた。

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

(6) 新規 NS5A 阻害剤耐性変異による薬剤感受性の解析

P32 欠損を導入したキメラウイルスを用いて各種 DAA に

対する薬剤感受性の評価を行った。この変異を持つ株は第二世代を含む全ての NS5A 阻害剤に対して強い耐性を示し、EC50 値は高値を示した。プロテアーゼ阻害剤は、P32 欠損株に対して通常の株とほぼ同様の抗ウイルス活性を示した。ポリメラーゼ阻害剤である SOF は P32 欠損株に強い抗ウイルス活性を示した。また IFN- $\alpha$  は通常の株とほぼ同様の、RBV は P32 欠損株に対して通常の株よりも強い抗ウイルス活性を示した。

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

(7) 感染性 HCV 粒子産生機構の解析

感染性 HCV 粒子産生効率を低下させるフルタミドは肝細胞内のトリグリセリド量低下により脂肪滴量を減少させることが示された。このトリグリセリド産生に関わる新たな因子の発現がフルタミドによって低下することが明らかとなった。またこの効果には芳香族炭化水素受容体阻害効果が重要であることが示唆された。

[大橋啓史, 渡士幸一, 深澤征義(細胞化学部), 脇田隆宇]

(8) 抗 HCV 治療の最適化の解析

既存あるいは開発段階にあるウイルスタンパク質を標的とした抗 HCV 剤(DAA)及び宿主側を標的とした化合物の計 10 化合物の単剤での薬効を定量評価し、薬剤によりヒル係数が固有であることが明らかとなった。次に 26 通りの 2 剤もしくは 3 剤併用での薬効を定量し相加相乗効果を評価した。この解析により 2 剤併用と比較して 3 剤併用がより強い抗ウイルス活性を示すことが示唆された。また宿主を標的とした化合物と DAA を組み合わせた 3 剤併用の薬効が DAA のみの 3 剤併用と同等の抗ウイルス活性を示した。この結果から宿主を標的とした化合物の抗 HCV 剤としての有用性が示唆された。

[大橋啓史, 中嶋翔, 渡士幸一, 小泉吉輝(金沢大), 岩見真吾(九州大), 田中靖人(名古屋大), Alan Perelson(ロスアラモス国立研), 脇田隆宇]

(9) HCV 中和エピトープを有する日本脳炎ウイルス(JEV)

#### 様粒子発現プラスミドによる抗 HCV 抗体の誘導

これまでに HCV 中和エピトープを有する JEV 様粒子が 2価ワクチン抗原として HCV および JEV に対する中和抗体を誘導する事を示した。これまでに比べてさらに多くの HCV 中和エピトープを挿入した JEV 様粒子と、HCV 中和エピトープ中の糖鎖修飾部位に変異を導入した JEV 様粒子を発現するプラスミドを BALB/c マウスに免疫した。より多くの中和エピトープを挿入したプラスミドを免疫したマウス血清は複数の遺伝子型の HCV に対して中和活性が認められた。一方で糖鎖修飾部位に変異を導入したプラスミドを免疫したマウス血清は HCV に対する中和活性が減弱した事から、HCV 中和エピトープ中の糖鎖の重要性が示唆された。

[矢藤慶悟, 松田麻未, 渡邊則幸, 田村浩二(東京理科大), 鈴木亮介]

#### (10) 遺伝子型 6 および 7 由来の1回感染性 C 型肝炎ウイルス粒子の作製

1回感染性 HCV 粒子(HCVtcp)は、細胞培養由来の C 型肝炎ウイルス(HCVcc)と同様の感染様式である事から、ワクチン接種により誘導される中和抗体の評価に有用である。我々はこれまでに遺伝子型1~5 由来の HCVtcp の作製に成功している。新たに遺伝子型 6 および 7 由来の HCVtcp を作製するために、それぞれの遺伝子型のコアタンパク質から NS2 までの領域を発現するプラスミドを構築した。これを用いて遺伝子型 6 および 7 由来の HCVtcp を作製し、Huh7.5.1 細胞へ感染させたところ、十分な感染価の HCVtcp の産生が認められた。これにより、より幅広い遺伝子型の HCV に対する中和抗体の評価が可能となった。

[矢藤慶悟, 遠坂崇, 松田麻未, 田村浩二(東京理科大), 脇田隆字, 鈴木亮介]

#### (11) HCV の株間における感染に必要なレセプター分子の違いの解析

細胞表面に発現している CD81、Claudin 1、SR-BI、occludin の4つの分子は、HCV の細胞への侵入に必須のレセプター分子として報告されている。しかしながら、こ

れまでの HCV の侵入過程の解析は、限られた株を用いて行われてきているため、多様性に富む HCV すべての株が同様にこれらのレセプターを必要としているかについては明らかではなかった。そこで遺伝子型1-5までの複数株由来の1回感染性 HCV(HCVtcp)を用い、感染に必要なレセプターを解析したところ、CD81 は試したすべての株で必須であったが、一部の株において Claudin 1 非依存性の感染を示した。さらに Claudin 1 非依存的に感染する株は Claudin 6 を代替として利用していた。現在 Claudin 6 を利用して感染するウイルス側の要因を解析している。  
[鈴木亮介, 矢藤慶悟, 遠坂崇, ススムエー, 松田麻未, 深澤征義(細胞化学部), 松浦善治(大阪大), 脇田隆字]

#### (12) HCV が PKR を活性化するメカニズムの解明

HCV が感染して慢性感染を成立させるために、宿主の自然免疫応答を制御する事が知られているが、そのメカニズムの1つとして、二本鎖 RNA 依存性プロテインキナーゼ(PKR)を活性化し、抗ウイルス作用を持つ宿主タンパク質の翻訳を抑制する事が知られている。しかしながら、HCV 感染による PKR の活性化メカニズムは未だ明らかではない。そこで HCV の PKR 活性化のメカニズムを調べるために、各ウイルス蛋白を発現させたところ、NS5B の単独発現により、PKR および eIF2 $\alpha$  のリン酸化が認められた。また免疫沈降法により NS5B と PKR の相互作用も認められた事から、NS5B タンパク質による新たな PKR 活性化機構の存在が明らかになった。

[鈴木亮介, 下池貴志, 松田麻未, 村山麻子, 加藤孝宣, 脇田隆字]

#### (13) HCV に対する抗ウイルス治療後、SVR 後の病態に関する研究

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

も肝臓組織にウイルスゲノムの残存が確認された。

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

#### (14) HCV 感染に伴う細胞微細構造変化の解析

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

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

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

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

[Lingbao Kong(江西農業大学), 山越智(生物活性物質部), 鈴木哲朗(浜松医科大学), 相崎英樹, 脇田隆字]

#### (16) スフィンゴ脂質の HCV 複製複合体を含む小胞形成における役割の解析

スフィンゴ脂質合成阻害剤により、HCV 複製が抑制されることを見出した。スフィンゴ脂質が DMV 形成に関わっている可能性が示された。

[グイード ホッサム, 深澤征義(細胞化学部), 花田賢太郎

(細胞化学部), 相崎英樹, 脇田隆字]

#### (17) 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(生物活性物質部), 小池和彦(東大消化器内科), 鈴木哲朗(浜松医科大学), 相崎英樹, 脇田隆字]

#### (18) HCV 感染に伴う核膜孔変化の解析

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

[ガオ ユーティン, 青柳東代, 相崎英樹, 山越智(生物活性物質部), 鈴木哲朗(浜松医科大学), 脇田隆字]

#### (19) HCV 粒子形成に関与する脂肪滴周辺膜蛋白の同定と機能解析

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

[フランク プイーバサゴイチ, 相崎英樹, 深澤征義(細胞化学部), 花田賢太郎(細胞化学部), 本島清人(明治薬科大学), 鈴木哲朗(浜松医科大学), 脇田隆字]

#### (20) 肝星細胞の HCV 感染性の解析

肝星細胞の活性化が肝線維化と密接に関連していることから、HCV が肝星細胞に感染増殖するかを明らかにすることは重要な課題である。HCV 感染細胞と星細胞共培養

すると HCV が星細胞に移行した。HCVRNA が複製活性を維持したまま、細胞間をエクソゾームを介して移動することを見いだした。

[Zheng Xin, 在津拓馬, 青柳東代, 相崎英樹, 松浦知和 (慈恵医大)、鈴木哲朗 (浜松医科大学), 脇田隆字]

#### (21) GL の Autophagy 誘導のメカニズムの解析

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

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

#### (22) 肝炎検査陽性者のフォローアップシステムの構築

肝炎ウイルス感染を知らずに治療を続けていない人も 7-120 万人も存在すると推定されている。そこで、肝炎ウイルス検査により見いだされた陽性者を専門医療機関へ導き、フォローアップすることを目的にしている。県・市 (A 県、東京都 A 市、神奈川県 A 市、愛知県 A 市、静岡県・香川県・福井県の市) をモデル地区として、陽性者をフォローアップした。

[相崎英樹, 飯島尋子 (兵庫医大), 石上 雅敏 (名古屋大学), 片野義明 (名古屋大学), 菊池嘉 (国立国際医療研究センター), 工藤正俊 (近畿大学), 坂本穰 (山梨大学), 島上哲朗 (金沢大学), 正木尚彦 (国立国際医療研究センター), 吉岡健太郎 (藤田保健), 米田政志 (愛知医大), 渡邊綱正 (名古屋市立大学), 脇田隆字]

#### (23) 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、肝臓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。感染症週報「HBV, HCV」を更新し、最新の治療について報告した。

[相崎英樹, 田中純子 (広島大), 脇田隆字]

#### (24) 本邦における急性 C 型肝炎のサーベイランス

感染症法に基づくサーベイランス事業で、1999 年から 2013 年間の 14 年間の急性 C 型肝炎の発生動向を調べ報告した。急性 C 型肝炎の発生は 2010 年ころから約 50 症例以下に抑制されていたものの、HIV 陽性同性愛者の性的感染が増加傾向を示し、遺伝子を調べたところ、同じウイルスが蔓延している可能性が示唆された。

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

#### (25) 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]

#### (26) 複製効率の良い 1b 型のサブゲノミックレプリコン (NC1 株) の構築

複製効率の良い 1b 型の C 型肝炎ウイルス株は未だに存在しないことから、1b 型レプリコンの樹立を試みた。ネオマイシン選択が可能な 1b 型レプリコンの合成 RNA を肝臓由来 Huh7.5.1 細胞にトランスフェクションし、選択培養後に残ったクローンの遺伝子解列から NS4B と NS5A 領域にアミノ酸変異を確認した。これらの変異の効果を調べるため、変異を導入した 8 個のレプリコンを作製し、コロニー形成

能を比較した。その結果、アミノ変異を持つレプリコン細胞ではコロニー形成能が野生型より高いことが明らかになった。

[Su Su Hmwe, 相崎英樹、村松正道、脇田隆字]

#### (27) 1b 型 C 型肝炎ウイルス(NC1 株)の作製

サブゲノミックレプリコンによるコロニー形成実験から得られた遺伝子変異を全長ウイルスに導入し 8 個の変異型ウイルスを作製した。それら 8 個の変異型 1b 型全長ウイルスの合成 RNA を Huh7.5.1 細胞にトランスフェクションし、継代培養を行い、上清中の HCV コア蛋白質量を経時的に測定した。長期間培養した結果、5 個の変異型において産生される HCV コアタンパク質量は低いものの、その産生は約 1 か月継続した。

[Su Su Hmwe, 相崎英樹、村松正道、脇田隆字]

#### (28) HCV 感染をモニターするための細胞株の樹立

HCV 感染を蛍光タンパク質でモニターできる細胞の樹立を試みた。具体的には、ATG-loxP-RFP-loxP-GFP をコードする発現プラスミドを構築して、Huh7.5.1 細胞に遺伝子導入後に薬剤選択を行った。その後、RFPタンパク質を発現する細胞群を Flow cytometer で分取して RG 細胞を樹立した。この細胞に Cre recombinase 遺伝子を組み込んだキメラ HCV を感染させると、HCV 感染細胞では RFP から GFP への蛍光タンパク質への遺伝子発現変化が起こる。はじめに、Cre タンパク質の発現プラスミドを遺伝子導入し、緑色の RG 細胞の出現を確認した。その後、HCV-cre キメラウイルスを RG 細胞に感染させ感染による色の変化も確認した。

[渡邊則幸、相崎英樹、村松正道、脇田隆字]

#### (29) HCV E2 モノクローナル抗体の樹立

E2 タンパク質単体よりも既知の中和抗体との反応性が高い E2-ferritin 融合タンパク質を抗原として免疫を行い、E2 モノクローナル抗体の樹立を行った。この抗原は粒子構造を形成し、粒子表面上に融合した E2 タンパク質が規則的に存在する。既知の中和抗体との反応性が高いことから、中和に重要な領域が効率よく表面に提示されている

ようである。免疫したマウスの脾臓からハイブリドーマを樹立し、ELISA 解析で現在までに4個の陽性クローンを得ている。これら4クローンの性状について解析を行っている。

[渡邊則幸、相崎英樹、村松正道、脇田隆字]

#### (30) 4a 型 C 型肝炎ウイルス感染系の構築

主にアフリカ大陸に分布する 4a 型 HCV 感染系の構築を試みた。14 種の変異型全長 ED43 遺伝子を細胞に導入後に継代培養を行った。上清中の HCV コア量が上昇した 2 クローンについて再感染を繰り返し、全長の遺伝子配列を決定した。それぞれ 7 個のアミノ酸変異が得られ、そのうち1つのアミノ酸変異は 2 クローンに共通だった。得られた 7 アミノ酸変異をすべて導入した 7M 変異型を構築し遺伝子導入後、継代培養を行った。その結果どちらのクローンについても安定的にウイルス産生が継続された。一方のクローンでは培養 100 日を超えた時点でも追加のアミノ酸変異は無かった。

[渡邊則幸、鈴木貴也、相崎英樹、村松正道、脇田隆字]

#### (31) 分泌配列を欠損した Jc1-Gluc ウイルス測定系の解析

我々は Jc1 に分泌型ルシフェラーゼ・Gluc を挿入したキメラウイルス Jc1-Gluc を作製し、Gluc の分泌配列内の 9 アミノ酸欠損 ( $\Delta 9AA$ ) がウイルス産生を上昇させることを明らかにした。そこで分泌配列自体のウイルス産生への影響を確認するために、分泌配列の 16 アミノ酸を欠損させた Jc1-Gluc  $\Delta 16AA$  を作製し、その性状を解析した。遺伝子導入後に継時的にウイルス量を測定したところ、Jc1-Gluc  $\Delta 9AA$  及び  $\Delta 16AA$  は野生型と比較してルシフェラーゼ活性及びコアタンパク質量が100倍以上高かった。今後は分泌配列欠損の影響を調べていきたい。

[佐藤李香、渡邊則幸、相崎英樹、村松正道、脇田隆字]

#### (32) Jc1-Gluc $\Delta 9AA$ の粒子構造の解析

外来遺伝子挿入によるウイルスの粒子構造への影響を調べるため、ショ糖密度勾配遠心法で Jc1-Gluc  $\Delta 9AA$  の粒子構造をオリジナルの Jc1 株と比較した。10-60%の不連続なショ糖密度勾配溶液に  $\Delta 9AA$  及び野生型 Jc1-Gluc

のウイルス上清を重層し超遠心を行った。分画した後、各フラクション中の感染性ウイルス量、コアタンパク質量を測定した。Jc1-Gluc Δ9AA は感染性ウイルス量及びコアタンパク質量について野生型と同様のピークを示したことから、Jc1-Gluc Δ9AA は粒子構造に影響なく効率的なウイルス産生を行っていることと示唆された。

[佐藤李香、渡邊則幸、相崎英樹、村松正道、脇田隆宇]

### (33)Sec14L2を発現する培養細胞の作製

これまで培養細胞で増殖出来る JFH-1 株を用いて C 型肝炎ウイルス (HCV) の不活化の評価を行ってきた。最近宿主因子 Sec14L2 は他の HCV 株の培養細胞での増殖に要であると報告された。JFH-1 以外の、感染者由来 HCV の不活化を評価するために、Sec14L2 を発現する数種の培養細胞を構築し、その細胞で Sec14L2 が発現していることを確認した。今後、この培養細胞を用いて、感染者由来の HCV を様々の条件で不活化し、その後この細胞を用いて感染性を指標に不活化の評価を行う。

[下池貴志、野島清子\*, 脇田隆宇、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) HEV レプリコンを用いたウイルス増殖阻害物質のスクリーニング

HEV レプリコン RNA を導入した細胞に薬剤ライブラリーを添加し、レプリコンのレポーター遺伝子の発現を指標として阻害剤のスクリーニングを行った。数種の化合物ライブラリーを用いて本レプリコンの増殖を抑制する化合物のスクリーニングを行ったところ、ウイルス増殖阻害活性を持つ化合物の一部に共通の作用機序が存在することを見出した。また、植物エキスイブラリーの一部にも強い増殖抑制活性を持つものが存在するため、これらのエキスの分画を行い活性成分の単離を行っている。[吉崎佐矢香、脇田隆宇、石井孝司]

### (2) HEV 非構造蛋白およびプロテアーゼ領域のコムギ胚芽無細胞系での発現と活性検出

HEV の非構造蛋白は、複製に必須な複数の酵素からなるポリプロテインである。また、プロテアーゼと推定される領域は、活性中心に変異を導入するとレプリコンの複製が見られなくなることからウイルス増殖に必須と考えられるが、非構造蛋白のプロセッシング機構等については不明のままであり、また毒性が強く大腸菌や哺乳類細胞での発現が極めて困難である。そのため、非構造蛋白をコードする ORF1 全長とプロテアーゼと推定される領域の2種について、コムギ胚芽無細胞系での発現を行い活性を検討した。その結果、ORF1 全長蛋白から弱いプロテアーゼ活性を確認することができた。今後、プロテアーゼ活性発現領域の同定と、ウイルス複製に果たす役割について検討する。  
[高橋宏隆、澤崎達也 (愛媛大学プロテオサイエンス研究センター)、吉崎佐矢香、脇田隆宇、石井孝司]

### (3) リバースジェネティクス法を用いた G5 HEV 感染クローンの作製及び人獣共通感染症の可能性

本研究では、in vitro で全長 G5 HEV RNA を合成し、G5 HEV RNA をヒト肝癌細胞 PLC/PRF/5 にトランスフェクションした。経時的に培養上清を採取し、ウイルス抗原と RNA を ELISA および RT-PCR により測定し、ウイルス増殖の有無を確認した。全長 G5 HEV RNA の感染性および霊長類への感染性を評価するため、培養上清をカニクイザルに接種した。細胞にウイルスを接種後培養上清から G5 HEV RNA および抗原が検出された。この培養上清を接種したカニクイザルの血清、糞便から G5 HEV が検出された。以上の結果により G5 HEV 全長 RNA が感染性を有することが明らかになり、G5 HEV の人獣共通感染の可能性も示唆された。

[李 天成、吉崎 佐矢香、Doan Hai Yen、\*高橋利明、\*三代俊治、\*網 康至、\*須崎百合子、脇田隆宇、村松正道 (\*動物管理室、\*\*東芝病院)]

### (4) Rat HEV ORF4 の機能の解析

Rat HEV の遺伝子構造は他の HEV と類似するが、Ferret HEV と同じ ORF4 というユニークなフレームを持っている。現在、ORF4 の機能はまだ明らかにされて



いない。本実験では Rat HEV (ドイツ株) rat HEV を用いて ORF4 のスタートコドン無くした全長 cDNA を作製したうえ、in vitro で RNA を合成した。ORF4 を持たない rat HEV RNA をヒト肝癌細胞 PLC/PRF/5 にトランスフェクションし、また、ヌードラット (Long Evans-rnu/rnu) 肝臓に直接に接種して、ウイルス増殖の変化を観察した。ORF4 を持たない rat HEV の増殖能が最初少し低いが、だんだん正常にもどった。塩基配列解析の結果、ORF4 のスタートコドンが回復した。

[李 天成、吉崎 佐矢香、\*網 康至、\*須崎百合子、脇田隆宇、村松正道 (\*動物管理室)]

#### (5) Nude rat と Rat HEV をモデルにした抗ウイルス剤の評価

Rat HEV をヌードラット (Long-Evans rnu/rnu) に感染させると、rat HEV の持続感染を呈する。この持続感染モデルは、薬剤の抗ウイルス効果の観察に好適であると考えられる。本実験では rat HEV を感染させたヌードラットにリバビリンを経口投与し、抗ウイルス効果を観察した。その結果、リバピリンの経口投与による抗ウイルス作用が確認された。抗ウイルス作用は投与量に相関していた。また、リバピリンによる副作用も確認された。しかし、リバピリン投与によるウイルス変異が認めなかった。

[李 天成、吉崎 佐矢香、\*網 康至、\*須崎百合子、脇田隆宇、村松正道 (\*動物管理室)]

#### (6) Genotype 6 HEV の感染性クローンの作製

本研究では、in vitro で全長 G6 HEV RNA を合成し、G6 HEV RNA をヒト肝癌細胞 PLC/PRF/5 にトランスフェクションした。経時的に培養上清を採取し、ウイルス抗原と RNA を ELISA および RT-PCR により測定し、ウイルス増殖の有無を確認したが、ウイルスの増殖が認められなかった。現在、シーケンスエラーの有無の確認作業をしている。

[李天成、吉崎 佐矢香、\*網 康至、\*須崎百合子、脇田隆宇、(\*動物管理室)]

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

Rabbit HEV はウサギから検出された新型 HEV であり、G3

に分類されているにもかかわらず、ヒト由来 G3 HEV に異なる宿主を持っている。Rabbit HEV 抗原性解析のため、本研究では Rabbit HEV の構造蛋白を組換えバキュロウイルスで発現し、ウイルス様粒子の作成を試みた。N 末端 13aa あるいは 111aa を欠失した DcHEV ORF2 を RT-PCR 法で増幅した。定法どおり作製した

#### (8) 牛、羊における HEV 感染の調査

最近、牛や羊などの家畜から HEV が感染され、そのミルクからも HEV が検出された報告があった。牛や羊などにおける HEV の感染状況を把握するのは重要である。日本と中国から牛と羊の血清を採取し、抗体及び HEVRNA を検査し、HEV の感染実態を明らかにする。これまでの結果では牛から HEV 陽性例がまだ見つからなかったが、羊から抗体陽性検体が存在するが、HEVRNA の検査が必要である。

[李天成、白慧敏、\*柯昌文、白慧敏、吉崎佐矢香、村松正道 [( \*中国広東 CDC)]

#### (9) 新しいフェレット E 型肝炎ウイルスの全長配列解析およびの病原性の検討

本研究ではアメリカから離乳前のフェレットを9匹購入し、経時的に採血と採便を行ない、血液中のウイルス抗原、抗体、ウイルス遺伝子、便中のウイルス抗原、抗体、およびウイルス遺伝子を測定した。また、血中の ALT/AST、 $\gamma$ GTP を測定することにより、ウイルスの感染の特徴および病原性等を検討した。離乳前のフェレットもすでに ferret HEV に感染され、フェレットにおける ferret HEV の感染は不顕性感染、急性肝炎、持続感染という3つのパターンをとることが示された。また、全長配列を解析した結果、これらのフェレットに感染した Ferret HEV は独自のクラスタを形成し、Ferret HEV の遺伝子の多様性が示唆された。

[李天成、吉崎佐矢香、\*片岡紀代、\*\*網康至、\*\*須崎百合子、Yen Hai Doan、芳賀慧、石井孝司、\*\*\*武田直和、脇田隆宇 (\*感染病理部、\*\*動物管理室、\*\*\*\*大阪大学微生物病研究所、日本・タイ感染症共同研究センター)

(10) 各加熱条件で処理した HEV の感染性低減効果についての評価

HEV G3 又は G4 を各々の温度と時間で加熱後、PLC/PRF/5 細胞に感染させ、HEV ゲノム RNA 量を定量し、3 週間後に HEV ゲノム RNA が検出できるか否かで HEV の加熱による不活化条件を評価した。その結果、厚生労働省が提唱する 63°C、30 分間の加熱では、G3、G4 共に感染性が失われていた。更に、65°C、5 分間の加熱では、G3、G4 共に感染性は失われていたが、65°C、1 分間の加熱では、G3、G4 共に感染性は保持されていた。一方で、70°C、5 分間の加熱では、G3、G4 共に感染性が失われていたが、70°C、1 分間の加熱では、G3 では感染性は不活化されたが、G4 では感染性を保持していた。

[杉山 隆一、\*今川 稔文、塩田 智之、李 天成、吉崎 佐矢香、石井 孝司、脇田 隆字 (\* 浜松医科大学)]

(11) 各加熱条件で処理した HEV 混合豚肉から抽出した HEV の感染性低減効果についての評価

HEV G3 又は G4 を豚挽肉と混ぜ、各々の温度と時間で加熱後、ウイルスを回収し、PLC/PRF/5 細胞に感染させ、3 週間後に培養上清から HEV ゲノム RNA が検出できるか否かで、豚挽肉に混入する HEV の加熱による不活化条件を評価した。その結果、厚生労働省が提唱する 63°C、30 分間の加熱では、G3、G4 共に感染性が失われていたが、63°C、5 分間の加熱では、不活化されなかった。更に、70°C、5 分間の加熱では、G3、G4 共に感染性が失われていたが、70°C、1 分間の加熱では、G3、G4 共に感染性を保持していた。また、65°C、5 分間の加熱では、G3 では感染性は不活化されたが、G4 では感染性を保持していた。

[杉山 隆一、\*今川 稔文、塩田 智之、李 天成、吉崎 佐矢香、石井 孝司、脇田 隆字 (\* 浜松医科大学)]

#### その他のウイルスに関する研究

(1) PLC/PRF/5 用いたブタ由来 Porcine Sapelovirus (PSV)の分離

HEV を分離するため、HEVRNA 陽性のブタ糞便サンプルを PLC/PRF/5 細胞に接種した。3 日後に細胞に明らかな CPE が観察され、さらに培養上清を新しい細胞に接種して同じような CPE が観察された。培養上清を超速心で濃縮し、塩化セシウム勾配密度遠心法でウイルスの精製を行い、電子顕微鏡で直径約 35nm の球形ウイルス粒子が観察された。その全長塩基配列解析によって分離されたウイルスは Porcine Sapelovirus (PSV)であることがわかった。さらに PSV の安定性を検討した。

[白慧敏、吉崎佐矢香、\*片岡紀代、\*\*武田直和、脇田隆字、李天成 (\*感染病理部、\*\*大阪大学微生物病研究所)]

(2) デングワクチンの免疫学的解析の為の抗原調製および中和アッセイ系の構築

CAG プロモーター下流にデング 1 型、2 型、3 型、4 型の prME 遺伝子をそれぞれ挿入し、その発現と上清への分泌を、免疫染色、ウェスタンブロッティング、銀染色で確認した。1 型以外は、細胞内での発現と上清への分泌が認められたが、解析に必要な抗原量を得るためにはさらなる改良が必要であると思われた。発現が確認できたデング 2 型、3 型、4 型の prME 発現プラスミドは、さらにデングウイルスレプリコンを用いて一回感染性のウイルスの作製に用いた。それぞれの一回感染性ウイルスを Vero 細胞へ感染させ、ワクチン接種動物血清の中和試験に必要な感染価を確認した。

[松田麻未、小原道法(東京都医学総合研究所)、鈴木亮介]

(3) 高力価の一回感染性フラビウイルス(SRIPs)産生のための細胞の最適化

我々はこれまでにサブゲノムレプリコンプラスミド(デング 1 型)、capsid 発現プラスミド(デング 1 型)、prME 発現プラスミド(任意のフラビウイルス)を 293T 細胞へ導入することで任意のフラビウイルス SRIPs を作製した。様々なフラビウイルス SRIPs を作製する中で、デングウイルス(2-4 型)は高い感染価の SRIP の作製が困難であった。そこで、これまで用いてきた 293T 細胞のシングルセルクローニングを行

い、高感染価の SRIPs を産生する細胞を選択した。高感染価のデングウイルス SRIPs が作製できる細胞は、これまでに使用していた 293T に比べて細胞の増殖が遅かった事から、細胞密度がフラビウイルス粒子産生の効率に関与している可能性が示唆された。

[松田麻未, 鈴木亮介]

#### (4) 高感染価の SRIPs 作製のための極小発光レポータータンパク質を導入したデングウイルスレプリコンプラスミドの構築

フラビウイルスレプリコンプラスミドへのレポーター遺伝子の挿入は、感染／複製をレポーター遺伝子の発現によりモニターできる利点があるものの、遺伝子挿入により感染価が低下する問題があった。そこでこれまで使用していた nanoLuc(171aa)から、わずか 11aa の極小レポータータンパク質(Hibit)に変えたレプリコンを構築した。スパーサータンパク質の長さや Hibit の挿入箇所の違う 4 種のレプリコンプラスミドを構築し、デングウイルスの prME およびキャプシド発現プラスミドと共に 293T 細胞へ導入し、上清から SRIPs を回収、Vero 細胞へ感染させ、感染を免疫染色とルシフェラーゼ活性の測定で評価した。スパーサー等挿入する塩基を最小限に設計したプラスミドを用い、NanoLuc 挿入レプリコンより高い感染価の SRIPs が作製可能となったが、検出されるルシフェラーゼ活性が低く、検出感度の改良が必要であると思われた。

[松田麻未, 福原崇介(阪大微研), 鈴木亮介]

#### (5) 高感染価 YFV-SRIPs 産生のためのレプリコンおよび prME の株の検討

デングウイルス SRIPs に加え、黄熱ウイルス(YFV)SRIPs も高感染価の SRIP の作製が困難であった。そこで NanoLuc 遺伝子を導入した YFV 由来レプリコンプラスミドを構築し、これをデング 1 型レプリコンの代わりに用いて SRIP を作製した。YFV 由来レプリコンプラスミドは、これまでに作製したデングウイルス1型および日本脳炎ウイルス由来のレプリコンプラスミドと比較し、約 10~100 倍高い感染価の SRIPs の産生が認められた。さらに YFV 由来の prME プラスミドについて、これまで用いていた 17D 株から

Uganda2010 株に変える事でより高い感染価の YFV-SRIP が得られた。

[松田麻未, 齊藤恭子(細胞化学部), 深澤征義(細胞化学部), 鈴木亮介]

### 発表業績一覧

#### I. 誌上発表

##### 1) 欧文発表

1)、Aghamohammadi A, Abolhassani H, Kutukculer N, Wassilak SG, Pallansch MA, Kluglein S, Quinn J, Sutter RW, Wang X, Sanal O, Latysheva T, Ikinogullari A, Bernatowska E, Tuzankina IA, Costa-Carvalho BT, Franco JL, Somech R, Karakoc-Aydiner E, Singh S, Bezrodnik L, Espinosa-Rosales FJ, Shcherbina A, Lau YL, Nonoyama S, Modell F, Modell V, [the JMF Centers Network Investigators and Study Collaborators](#), Barbouche MR, McKinlay MA. Patients with Primary Immunodeficiencies Are a Reservoir of Poliovirus and a Risk to Polio Eradication. *Frontiers in immunology* 8: 685, 2017 [Shimizu H, contributed as one of the JMF Centers Network Investigators and Study Collaborators]

2)、Akagami M, Ito M, Niira K, Kuroda M, Masuda T, Haga K, Tsuchiaka S, Naoi T, Kishimoto M, Sano K, Omatsu T, Aoki H, Katayama Y, Oba M, [Oka T](#), Ichimaru T, Yamasato H, Ouchi Y, Shirai J, Katayama K, Mizutani T, Nagai M. Complete genome analysis of porcine kobuviruses from the feces of pigs in Japan *Virus Genes*, 2017 Aug; 53: 593-602,

3) 、Bartenschlager R, Baumert TF, Bukh J, Houghton M, Lemon SM, Lindenbach BD, Lohmann V, Moradpour D, Pietschmann T, Rice CM, Thimme R, [Wakita T](#). Critical challenges and emerging opportunities in hepatitis C virus research in an era of potent antiviral therapy:

Considerations for scientists and funding agencies. *Virus Res.* 2018 Mar 15;248:53-62.

4) 、Chong PF, Kira R, Mori H, Okumura A, Torisu H, Yasumoto S, Shimizu H, Fujimoto T, Hanaoka N, Kusunoki S, Takahashi T, Oishi K, Tanaka-Taya K Acute Flaccid Myelitis Collaborative Study I. Clinical Features of Acute Flaccid Myelitis Temporally Associated With an Enterovirus D68 Outbreak: Results of a Nationwide Survey of Acute Flaccid Paralysis in Japan, August-December 2015. *Clin Infect Dis* 66: 653-664, 2018

5) 、Doan YH, Suzuki Y, Fujii Y, Haga K, Fujimoto A, Takai-Todaka R, Someya Y, Nayak MK, Mukherjee A, Imamura D, Shinoda S, Chawla-Sarkar M, Katayama K: Complex reassortment events of unusual G9P[4] rotavirus strains in India between 2011 and 2013. *Infect Genet Evol.* 2017, 54: 417-428

6) 、Fukuhara T, Tamura T, Ono C, Shiokawa M, Mori H, Uemura K, Yamamoto S, Kurihara T, Okamoto T, Suzuki R, Yoshii K, Kurosu T, Igarashi M, Aoki H, Sakoda Y, Matsuura Y. Host-derived apolipoproteins play comparable roles with viral secretory proteins Erns and NS1 in the infectious particle formation of Flaviviridae. *PLoS Pathog.* e1006475. (2017).

7) 、Fukushima S., Kiyohara T, Ishii K, Nakano T. and Hamada A. Immunogenicity of aluminum-adsorbed hepatitis A vaccine (Havrix®) administered as a third dose after primary doses of Japanese aluminum-free hepatitis A vaccine (Aimmugen®) for Japanese travelers to endemic countries. *Vaccine* 35: 6412-6415 (2017)

8) 、Hansen MD, Johnsen IB, Stiberg KA, Sherstova T, Wakita T, Richard GM, Kandasamy RK, Meurs EF, Anthonsen MW. Hepatitis C virus triggers Golgi fragmentation and autophagy through the immunity-related GTPase M. *Proc Natl Acad Sci U S A.*

2017 Apr 25;114(17):E3462-E3471.

9) 、Hasegawa K, Yuichi Someya, Hideki Shigematsu, Tomomi Kimura-Someya, Takashi Kumasaka Crystallization and preliminary X-ray analysis of 23-nm virus-like particles from norovirus Chiba strain. *Acta Crystallography, F73*, 568-573, 2017.

10) 、Huimin Bai, Ling Fang, Michiyo Kataoka, Naokazu Takeda, Takaji Wakita and Tian-Cheng Li\* Characterization of Porcine Sapelovirus Isolated from Japanese Swine with PLC/PR。F/5 Cells. *Transbound Emerg Dis.* 2017 Dec 28. doi: 10.1111/tbed.12796

11) 、Ito M, Sun S, Fukuhara T, Suzuki R, Tamai M, Yamauchi T, Nakashima K, Tagawa Y, Okazaki S, Matsuura Y, Wakita T, Suzuki T. Development of hepatoma-derived, bidirectional oval-like cells as a model to study host interactions with hepatitis C virus during differentiation. *Oncotarget.* 33:53899-53915. (2017).

12) 、Iwamoto M, Cai D, Sugiyama M, Suzuki R, Aizaki H, Ryo A, Ohtani N, Tanaka Y, Mizokami M, Wakita T, Guo H, Watashi K. Functional association of cellular microtubules with viral capsid assembly supports efficient hepatitis B virus replication. *Sci Rep* 7: 10620 (2017)

13) 、Kai Y, Hikita H, Morishita N, Murai K, Nakabori T, Iio S, Hagiwara H, Imai Y, Tamura S, Tsutsui S, Naito M, Nishiuchi M, Kondo Y, Kato T, Suemizu H, Yamada R, Oze T, Yakushijin T, Hiramatsu N, Sakamori R, Tatsumi T, Takehara T. Baseline quasispecies selection and novel mutations contribute to emerging resistance-associated substitutions in hepatitis C virus after direct-acting antiviral treatment. *Sci Rep.* 7: 41660. doi: 10.1038/srep41660, 2017.

14) 、Kaneko M, Futamura Y, Tsukuda S, Kondoh Y, Sekine T, Hirano H, Fukano K, Ohashi H, Saso W, Morishita R, Matsunaga S, Kawai F, Ryo A, Park SY, Suzuki R, Aizaki H, Ohtani N, Sureau C, Wakita T, Osada

- H, Watashi K. Chemical array system, a platform to identify novel hepatitis B virus entry inhibitors targeting sodium taurocholate cotransporting polypeptide. *Sci Rep.* 8(1):2769. (2018)
- 15)、Kato M, Hamada-Tsutsumi S, Okuse C, Sakai A, Matsumoto N, Sato M, Sato T, Arito M, Omoteyama K, Suematsu N, Okamoto K, Kato T, Itoh F, Sumazaki R, Tanaka Y, Yotsuyanagi H, Kato T, Kurokawa-Suzuki M. Effects of vaccine-acquired polyclonal anti-HBs antibodies on the prevention of HBV infection of non-vaccine genotypes. *J Gastroenterol.* doi: 10.1007/s00535-017-1316-3, 2017.
- 16)、Hasegawa K, Yuichi Someya, Hideki Shigematsu, Tomomi Kimura-Someya, Takashi Kumasaka Crystallization and preliminary X-ray analysis of 23-nm virus-like particles from norovirus Chiba strain. *Acta Crystallography*, F73, 568-573, 2017.
- 17)、Kitamura K, Que L, Shimadu M, Koura M, Ishihara Y, Wakae K, Nakamura T, Watashi K, Wakita T, Muramatsu M. Flap endonuclease 1 is involved in cccDNA formation in the hepatitis B virus. *PLoS Pathog.* 2018 Jun 21;14(6):e1007124.
- 18)、Koizumi Y, Ohashi H, Nakajima S, Tanaka Y, Wakita T, Perelson AS, Iwami S, Watashi K. Quantifying antiviral activity optimizes drug combinations against hepatitis C virus infection. *Proc Natl Acad Sci USA* 114: 1922-1927 (2017)
- 19)、Kondo K, Tsugawa T, Ono M, Ohara T, Fujibayashi S, Tahara Y, Kubo N, Nakata S, Higashidate Y, Fujii Y, Katayama K, Yoto Y, Tsutsumi H: Clinical and Molecular Characterization of the 2014 G8P[8] Rotavirus Outbreak in Japan. *Emerg Infect Dis.* 2017, 23(6):968-972
- 20)、Kuroda M, Masuda T, Ito M, Naoi Y, Doan YH, Haga K, Tsuchiaka S, Kishimoto M, Sano K, Omatsu T, Katayama Y, Oba M, Aoki H, Ichimaru T, Sunaga F, Mukono I, Yamasato H, Shirai J, Katayama K, Mizutani T, Oka T, Nagai M. Genetic diversity and intergenogroup recombination events of sapoviruses detected from feces of pigs in Japan. *Infection, Genetics and Evolution*, 2017 Nov; 55: 209-217,
- 21)、Kuroda M, Masuda T, Ito M, Naoi Y, Doan YH, Haga K, Tsuchiaka S, Kishimoto M, Sano K, Omatsu T, Katayama Y, Oba M, Aoki H, Ichimaru T, Sunaga F, Mukono I, Yamasato H, Shirai J, Katayama K, Mizutani T, Oka T, Nagai M. Genetic diversity and intergenogroup recombination events of sapoviruses detected from feces of pigs in Japan. *Infect Genet Evol* 55: 209-217, 2017
- 22)、Li TC, Yoshizaki S, Ami Y, Suzaki Y, John R, Wakita T. No evidence of rat hepatitis E virus excretion into urine of rats. *Jpn J Infect Dis.* 70: 305-307 (2017)
- 23)、Li TC, Yoshizaki S, Kataoka M, Ami Y, Suzaki Y, Doan YH, Haga K, Ishii K, Takeda N, Wakita T. Genetic and physicochemical analyses of a novel ferret hepatitis E virus, and clinical signs of infection after birth. *Infect Genet Evol* 51:153-159, 2017
- 24)、Li TC, Yoshizaki S, Kataoka M, Doan YH, Ami Y, Suzaki Y, Nakamura T, Takeda N, Wakita T. Determination of Ferret Enteric Coronavirus Genome in Laboratory Ferrets. *Emerg Infect Dis* 23: 1568-1570, 2017
- 25)、Li TC, Yoshizaki S, Zhou X, Sentsui H, Shirato K, Matsuyama S, Melaku SK, Bazartseren B, Takeda N, Wakita T. Serological evidence of hepatitis E virus infection in dromedary camels in Ethiopia. *J Virol Methods.* 246: 34-37 (2017)
- 26)、Li TC, Yoshizaki S, Kataoka M, Ami Y, Suzaki Y, Doan Y.H., Haga K., Ishii K, Takeda N. and Wakita T. Genetic and physicochemical analyses of a novel ferret hepatitis E virus, and clinical signs of infection after birth. *Infection, Genetics and Evolution* 25: 153-159 (2017)

- 27) 、Loo TM, Kamachi F, Watanabe Y, Yoshimoto S, Kanda H, Arai Y, Nakajima-Takagi Y, Iwama A, Koga T, Sugimoto Y, Ozawa T, Nakamura M, Kumagai M, Watashi K, Taketo MM, Aoki T, Narumiya S, Oshima M, Arita M, Hara E, Ohtani N. Gut microbiota promotes obesity-associated liver cancer through PGE2-mediated suppression of antitumor immunity. *Cancer Discov* 7: 522-538 (2017)
- 28) 、Mizukoshi F, Nagasawa K, Doan YH, Haga K, Yoshizumi S, Ueki Y, Shinohara Ishikawa M, Sakon N, Shigemoto N, Okamoto-Nakagawa R, Ochi A, Murakami K, Ryo A, Suzuki Y, Katayama K, Kimura H. Molecular Evolution of the RNA-Dependent RNA Polymerase and Capsid Genes of Human Norovirus Genotype GII.2 in Japan during 2004-2015. *Front Microbiol.* 8:705, 2017
- 29) 、Murayama A, Sugiyama N, Suzuki R, Moriyama M, Nakamura M, Mochizuki H, Wakita T, Kato T. Amino Acid Mutations in the NS4A Region of Hepatitis C Virus Contribute to Viral Replication and Infectious Virus Production. *J Virol.* 91. doi:10.1128/JVI.02124-16, 2017.
- 30) 、Noguchi A, Ito H, Miura S, Fujii Y, Katayama K, Nakagomi T, Nakagomi O, Takahashi T. Regional variations in the incidence of rotavirus hospitalizations between children living in defined regions of Akita and Kyoto prefectures, Japan. *Jpn J Infect Dis.* 2017, 70(2):167-170.
- 31) 、Ogura N, Ogawa K, Watashi K, Ito T, Wakita T. Novel stable HBV producing cell line systems for expression and screening antiviral inhibitor of hepatitis B virus in human hepatoma cell line. *Biochem Biophys Res Commun.* 498(1):64-71 (2018)
- 32) 、Ohashi H, Koizumi Y, Fukano K, Wakita T, Perelson AS, Iwami S, Watashi K. Reply to Padmanabhan and Dixit: Hepatitis C virus entry inhibitors for optimally boosting direct-acting antiviral-based treatments. *Proc Natl Acad Sci USA* 114: E4527-E4529 (2017)
- 33) 、Ohba M, Oka T, Ando T, Arahata S, Ikegaya A, Takagi H, Ogo N, Zhu C, Owada K, Kawamori F, Wang Q, Saif LJ, Asai A. Antiviral effect of theaflavins against caliciviruses. *The Journal of Antibiotics* (2017) 70, 443–447.
- 34) 、Oka T, Doan YH, Haga K, Mori K, Ogawa T, Yamazaki A. Genetic characterization of rare genotype GII.5 sapovirus strain detected from food-borne suspected gastroenteritis outbreak among adults in Japan, 2010. *Jpn J Infect Dis.* 2017; 70: 223-224.
- 35) Oka T, Doan YH, Shimoike T, Haga K, Takizawa K. First complete genome sequences of genogroup V, genotype 3 porcine sapoviruses: common 5'-terminal genomic feature of sapoviruses *Virus Genes*, 2017 Dec; 53: 848-855,
- 36) 、Oka T, Iritani N, Okada M, Ogawa T, Iizuka S, Tatsumi C, Harada S, Haga K, Doan YH. First Complete Genome Sequences of Human Sapovirus Strains Classified as GI.3, GI.4, GI.6, GI.7, and GII.7. *Genome Announc.* 2018 Mar 22;6(12). pii: e00168-18.
- 37) 、Oka T, Stoltzfus GT, Zhu C, Jung K, Wang Q, Saif LJ. Attempts to grow human noroviruses, a sapovirus, and a bovine norovirus in vitro. *PLoS One*, 2018 Feb;13(2):e0178157.
- 38) 、Ono C, Fukuhara T, Motooka D, Nakamura S, Okuzaki D, Yamamoto S, Tamura T, Mori H, Sato A, Uemura K, Fauzyah Y, Kurihara T, Suda T, Nishio A, Hmwe SS, Okamoto T, Tatsumi T, Takehara T, Chayama K, Wakita T, Koike K, Matsuura Y. Characterization of miR-122-independent propagation of HCV. *PLoS Pathog.* 2017 May 11;13(5):e1006374.
- 39) 、Pham NTK, Thongprachum A, Baba T, Okitsu S, Trinh QD, Komine-Aizawa S, Shimizu H, Hayakawa S,

- Ushijima H. A 3-month-old child of acute gastroenteritis with enterovirus D68 detected from stool specimen. Clin. Lab 63: 1269-1272, 2017
- 40)、Pham NTK, Thongprachum A, Trinh QD, Okitsu S, Komine-Aizawa S, Shimizu H, Hayakawa S Ushijima H. Detection and genetic characterization of enterovirus strains circulating among children with acute gastroenteritis in Japan during 2014-2016. Infect Genet Evol 61: 16-19, 2018
- 41)、Que L, Liu G, Kitamura K, Wakae K, Li Y, Nishitsuji H, Ujino S, Shimotohno K, Muramatsu M. Molecular characterization of AID-mediated reduction of hepatitis B virus transcripts. Virology. 2017;510:281-288.
- 42)、Ruchusatsawat K., Wongpiyabovorn J., Kawidam C., Thiemsing L., Sangkitporn S., Yoshizaki S., Tatsumi M., Takeda N. and Ishii K. An Outbreak of Acute Hepatitis Caused by Genotype IB Hepatitis A Viruses Contaminating the Water Supply in Thailand. Intervirology 59: 197-203 (2017)
- 43)、.Sakurai F, Kunito T, Takayama K, Hashimoto R, Tachibana M, Sakamoto N, Wakita T, Mizuguchi H. Hepatitis C virus-induced innate immune responses in human iPS cell-derived hepatocyte-like cells. Virus Res. 2017 Sep 9;242:7-15.
- 44)、.Sakurai F, Mitani S, Yamamoto T, Takayama K, Tachibana M, Watashi K, Wakita T, Iijima S, Tanaka Y, Mizuguchi H. Human induced-pluripotent stem cell-derived hepatocyte-like cells as an in vitro model of human hepatitis B virus infection. Sci Rep 7: 45698 (2017)
- 45 )、Sato H, Yokoyama M, Nakamura H, Oka T, Katayama K, Takeda N, Noda M, Tanaka T, Motomura K. Evolutionary Constraints on the Norovirus Pandemic Variant GII.4\_2006b over the Five-Year Persistence in Japan. Front Microbiol. 2017 13;8:410.
- 46)、Scott T, Moyo B, Nicholson S, Maepa MB, Watashi K, Ely A, Weinberg MS, Arbutnot P. ssAAVs containing cassettes encoding SaCas9 and guides targeting hepatitis B virus inactivate replication of the virus in cultured cells. Sci Rep 7: 7401 (2017)
- 47)、Seishima N, Kondo S, Wakae K, Wakisaka N, Kobayashi E, Kano M, Moriyama-Kita M, Nakanishi Y, Endo K, Imoto T, Ishikawa K, Sugimoto H, Hatano M, Ueno T, Koura M, Kitamura K, Muramatsu M, Yoshizaki T. Expression and subcellular localisation of AID and APOBEC3 in adenoid and palatine tonsils. Sci Rep. 2018 Jan 17;8(1):918.
- 48)、Shimura S, Watashi K, Fukano K, Peel M, Sluder A, Kawai F, Iwamoto M, Tsukuda S, Takeuchi JS, Miyake T, Sugiyama M, Ogasawara Y, Park SY, Tanaka Y, Kusuhara H, Mizokami M, Sureau C, Wakita T. Cyclosporin derivatives inhibit hepatitis B virus entry without interfering the NTCP transporter. J Hepatol 66: 685-692 (2017)
- 49)、Sugiyama R, Murayama A, Nitta S, Yamada N, Tasaka-Fujita M, Masaki T, Aly HH, Shiina M, Ryo A, Ishii K, Wakita T, Kato T. Interferon sensitivity-determining region of hepatitis C virus influences virus production and interferon signaling. Oncotarget. 2017 21;9(5):5627-5640.
- 50)、Sun S, Nakashima K, Ito M, Li Y, Chida T, Takahashi H, Watashi K, Sawasaki T, Wakita T, Suzuki T. Involvement of PUF60 in Transcriptional and Post-transcriptional Regulation of Hepatitis B Virus Penomic RNA Expression. Sci Rep 7: 12874 (2017)
- 51)、Iizuka T, Kousho Wakae, Mitsuhiro Nakamura, Koichi Kitamura, Masanori Ono, Hiroshi Fujiwara, and Masamichi Muramatsu APOBEC3G is increasingly expressed on the human uterine cervical intraepithelial neoplasia along with disease progression Am J Reprod

Immunol\_ 2017 Oct;78(4).

52) 、Thongprachum A, Khamrin P, Thi Kim Pham N, Takanashi S, Okitsu S, Shimizu H, Maneekarn N, Hayakawa S Ushijima H. Multiplex RT-PCR for rapid detection of viruses commonly causing diarrhea in pediatric patients. *J Med Virol* 89: 818-824, 2017

53) 、Tsukuda S, Watashi K, Hojima T, Isogawa M, Iwamoto M, Omagari K, Suzuki R, Aizaki H, Kojima S, Sugiyama M, Saito A, Tanaka Y, Mizokami M, Sureau C, Wakita T. A new class of hepatitis B and D virus entry inhibitors, proanthocyanidin and its analogs, that directly act on the viral large surface proteins. *Hepatology* 65: 1104-1116 (2017)

54) 、Utsumi T, Lusida MI, Dinana Z, Wahyuni RM, Yamani LN, Juniastuti, Soetjipto, Matsui C, Deng L, Abe T, Doan YH, Fujii Y, Kimura H, Katayama K, Shoji I: Occurrence of norovirus infection in an asymptomatic population in Indonesia. *Infect Genet Evol.* 2017, 55:1-7.

55) 、Utsumi T, Wahyuni RM, Doan YH, Dinana Z, Soegijanto S, Fujii Y, Juniastuti, Yamani LN, Matsui C, Deng L, Abe T, Soetjipto, Lusida MI, Ishii K, Shimizu H, Katayama K Shoji I. Equine-like G3 rotavirus strains as predominant strains among children in Indonesia in 2015-2016. *Infect Genet Evol* 61: 224-228, 2018

56) 、Wang W, Wang Y, Qu C, Wang S, Zhou J, Cao W, Xu L, Ma B, Hakim MS, Yin Y, Li TC, Peppelenbosch MP, Zhao J, Pan Q. The RNA genome of hepatitis E virus robustly triggers an antiviral interferon response. *Hepatology.* 2018 67(6): 2096-2112. doi: 10.1002/hep.29702.

57) 、Watanabe R, Mizoguchi H, Oikawa H, Ohashi H, Watashi K, Oguri H. Stereo-controlled synthesis of functionalized tetrahydropyridines based on the cyanomethylation of 1,6-dihydropyridines and generation

of anti-hepatitis C virus agents. *Bioorg Med Chem* 25: 2851-2855 (2017)

58) 、Yamada N, Sugiyama R, Nitta S, Murayama A, Kobayashi M, Okuse C, Suzuki M, Yasuda K, Yotsuyanagi H, Moriya K, Koike K, Wakita T, Kato T. Resistance mutations of hepatitis B virus in entecavir-refractory patients. *Hepatology Comm.* 1: 110-121, 2017.

59) 、Yamanaka A, Moi ML, Takasaki T, Kurane I, Matsuda M, Suzuki R, Konishi E. Utility of Japanese encephalitis virus subgenomic replicon-based single-round infectious particles as antigens in neutralization tests for Zika virus and three other flaviviruses. *J Virol Methods.* 243:164-171. (2017).

60) 、Yao WL, Ikeda S, Tsukamoto Y, Shindo K, Otakaki Y, Qin M, Iwasawa Y, Takeuchi F, Kaname Y, Chou YC, Chang C, Watashi K, Wakita T, Noda T, Kato H, Fujita T. Establishment of a human hepatocellular cell line capable of maintaining long-term replication of hepatitis B virus. *Int Immunol* 29: 109-120 (2017)

61) 、Yasumoto J, Kasai H, Yoshimura K, Otaguro T, Watashi K, Wakita T, Yamashita A, Tanaka T, Takeda S, Moriishi K. Hepatitis B virus prevents excessive viral production via reduction of cell-death inducing DFF45-like effectors. *J Gen Virol* 98: 1762-1773 (2017)

62) 、Yokoyama M, Oka T, Takagi H, Kojima H, Okabe T, Nagano T, Tohya Y, Sato H. A Proposal for a Structural Model of the Feline Calicivirus Protease Bound to the Substrate Peptide under Physiological Conditions *Frontiers in Microbiology,* 2017 Jul; 8: 1383

63) 、Someya Y, Yasushi Ami, Reiko Takai-Todaka, Akira Fujimoto, Kei Haga, Kosuke Murakami, Yoshiaki Fujii, Haruko Shirato, Tomoichiro Oka, Takashi Shimoike, Kazuhiko Katayama, and Takaji Wakita. Evaluation of the use of various rat strains for immunogenic potency tests of



Sabin-derived inactivated polio vaccines. *Biologicals*, 52, 12-17, 2018.

64)、Arita M., Dobrikov G., Pürstinger G., Galabov AS. Allosteric regulation of phosphatidylinositol 4-kinase III beta by an anti-picornavirus compound MDL-860. *ACS Infectious Diseases*, 3: 585-594, 2017

## 2. 和文発表

1)李天成、吉崎佐矢香、網康至、須崎百合子、団海燕、芳賀慧、高橋利明、三代俊治、武田直和、脇田隆宇。A Potential Zoonotic Infection of G5 Hepatitis E Virus Produced by Reverse Genetics System。第64回日本ウイルス学会学術集会、2017年10月大阪。口頭発表

2)李天成、白慧敏、吉崎佐矢香、網康至、須崎百合子、団海燕、芳賀慧、高橋利明、三代俊治、武田直和、脇田隆宇。ラット E 型肝炎ウイルス持続感染ヌードラットをモデルにした抗ウイルス薬の評価。第160回日本獣医学会学術集会、2017年9月鹿児島。口頭発表

3)岡智一郎、ノロウイルスの予防と治療  
*臨床と微生物*, 近代出版, 44: 69-72 2017.11.25

4)岡智一郎、食品衛生検査指針 微生物  
編 2018  
「サポウイルス」  
公益社団法人 日本食品衛生協会, PP.683-691,  
2018.3.25

5)久留主達也, 渡士幸一, 岩見真吾: B型肝炎ウイルスの細胞内侵入に関する数理モデリング(第13回生物数学の理論とその応用: 連続および離散モデルのモデリングと解析) 数理解析研究所講究録、2017; 2043; 95-1015)

6)吉田弘。ポリオ根絶計画の最終段階と環境水サーベイ

ランスの意義。日本小児科医会会報 55: 124-127, 2018

7)吉田弘。環境水サーベイランスの意義並びに実態から見えてくる予防医学に関わる知見 東京小児科医会報 36: 26-30, 2017

8)吉田弘, 高橋雅輝, 濱崎光宏, 山下育孝, 四宮博人, 山下照夫, 皆川洋子, 岸本剛, 調恒明 エンテロウイルス検査の信頼性確保について 病原体検出情報 38: 199-200, 2017年10月号

9)吉田弘。海外における無菌性髄膜炎等を対象とした病原体サーベイランスの動向 病原体検出情報 39: 101-102, 2018年6月号

10)崎山 弘、城 青衣、梅本 哲、清水博之、大石和徳。全国調査による我が国の定期接種ワクチンの累積接種率。外来小児科 20: 272-282, 2017

11)斎藤博之、秋野和華子、佐藤寛子、藤谷陽子、柴田ちひろ、佐藤了悦、清水博之。乳飲みマウスによるエンテロウイルス D68 型の分離-秋田県。病原微生物検出情報 38: 10-11, 2017

12)染谷雄一、清水博之。ポリオワクチンとポリオウイルスのバイオリスク管理。ウイルス 68, 31-40, 2018

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

14)清水博之: エンテロウイルスD68のウイルス学的性状。神経感染症学雑誌 23, 62-66, 2018

15)清水博之。世界ポリオ根絶に向けた動きとわが国の対応。小児科ワクチンUp-To-Date 4: 2017

- 16) 清水博之. エンテロウイルスD68感染症の大規模流行、その後. 臨床とウイルス 45: 256-263, 2017
- 17) 清水博之. アジア諸国における手足口病(エンテロウイルスA71)ワクチン開発と導入. 病原微生物検出情報 38: 13-14, 2017
- 18) 藤本嗣人、花岡希、小長谷昌未、清水博之. 2000～2017年における2000～2017年におけるエンテロウイルスA71(EV-A71)の全国および世界における検出状況. 病原微生物検出情報 38: 11-12, 2017
- 19) 清水博之. エンテロウイルスと子どもの麻疹. 小児保健研究 76, 208-217 2017
- 20) 清水博之. 世界ポリオ根絶に向けた最終段階計画. 公衆衛生 81, 584-590, 2017
- 21) 清水博之. エンテロウイルス感染症. 医師会雑誌 146, 259-263, 2017
- 22) 清水博之. ポリオ. 化学療法の領域 33 : 40-48, 2017
- 23) 清水博之. ポリオウイルス病原体バイオリスク管理に関するWHO行動計画(GAP III)と今後の課題. JBSA Newsletter, 6 2017
- 24) 藤井克樹: ロタウイルスの遺伝子型別法に関する注意病原微生物検出情報 (IASR) 2017, 38(8) 172-4.
2. Aly HH, Suzuki J, Watashi K, Chayama K, Kato T, Wakita T. Targeting HBV-X by regulating Non-Stop mediated RNA decay. Japan-Taiwan-Korea HBV Research Symposium. April 8-9, 2017, Tokyo, Japan.
3. Aly HH. HBx mRNA degradation by RNA exosome which results X protein regulation in HBV infected cells. 20th International Conference on Emerging Infectious Diseases in the Pacific. Jan. 8-11, 2018. Shenzhen, China.
4. Ettayebi K, Cortes-Penfield NW, Tenge VR, Ayyar BV, L SC, Haga K, Murakami K, Crawford SE, Neill FH, Ramani S, Karandikar U, Zeng XL, Yu X, Atmar RL, Estes MK. Human Norovirus Cultivation in Stem Cell-Derived Human Enteroids: Successes and Challenges. NoroCORE Final Showcase Meeting, March 2018, Atlanta, USA.
5. Fukano E, Shimura S, Peel M, Sluder A, Kawai F, Tsukuda S, Suzuki R, Aizaki H, Park SY, Wakita T, Ogasawara Y, Watashi K. Identification of HBV entry inhibitors without interfering with the NTCP transporter activity. 5th JAPAN-TAIWAN-KOREA HBV Research Symposium 2017. 2017/4/8-9. Tokyo (Japan)
6. Fukano K, Shimura S, Peel M, Sluder A, Kawai F, Tsukuda S, Suzuki R, Aizaki H, Park SY, Wakita T, Ogasawara Y, Watashi K. Identification of HBV entry inhibitors without interfering with the NTCP transporter activity. 5th JAPAN-TAIWAN-KOREA HBV Research (Japan). Symposium 2017. 2017/4/8-9. Tokyo
7. Hotta H, Chen M, Aoki-Utsubo C, Deng L, Watashi K, Wakita T. Supporting evidence that HBV virions

## II. 学会発表

### 1. 国際学会

1. Aly HH, Saito T. A Balancing Act: Hepatic Antiviral Innate Immune Defense and Viral Evasion. 20th International Conference on Emerging Infectious

- bud mainly through the ER/ERGIC membranes. 2017 International HBV Meeting The Molecular Biology of Hepatitis B Viruses. 2017/9/3-7 Washington DC (USA).
8. Iwamoto M, Cai D, Sugiyama M, Suzuki R, Aizaki H, Ryo A, Ohtani N, Tanaka Y, Mizokami M, Wakita T, Guo H, Watashi K. The integrity of cellular microtubule structure is important for an efficient HBV capsid formation. 2017 International HBV Meeting The Molecular Biology of Hepatitis B Viruses. 2017/9/3-7 Washington DC (USA).
  9. Iwamoto M, Sugiyama M, Suzuki R, Aizaki H, Tanaka Y, Mizokami M, Ohtani N, Wakita T, Watashi K. Hepatitis B virus capsid formation is regulated by microtubules and their posttranslational modification. 5th JAPAN-TAIWAN-KOREA HBV Research Symposium 2017. 2017/4/8-9. Tokyo (Japan).
  10. Li TC, Yoshizaki S, Suzaki Y, Ami Y, Doan YH, Haga H, Takahashi K, Mishihiro S, Takeda N, Wakita T. Potential Zoonotic Infection of G5 Hepatitis E Virus Produced by Reverse Genetics System. Annual Meeting of the Japanese Society for Virology, Osaka, Japan. 2017 October 24-26. Poster presentation
  11. Masamichi Muramatsu. HBV cccDNA formation by a host repair factor, FEN1 36<sup>th</sup> US-Japan Hepatitis Panel Meeting Shenzhen, China January 11. 2018 invited oral
  12. Miyazaki M, Saito H, Shibata C, Yen DH, Arao Y, Iwata-Yoshikawa N, Hasegawa H, Shimizu H, Nagata N. Development of a flaccid paralysis mouse model after infection of enterovirus D68. Annual Meeting of the Japanese Society for Virology, Osaka, Japan. 2017 October 24-26. (Poster presentation)
  13. Murakami K, Tenge VR, Ettayebi K, Crawford SE, Neill FH, Ramani S, Zeng X, Atmar RL, Estes MK. Characterization of the mechanism of bile requirement for GII.3 human norovirus replication in human intestinal enteroids. American Society for Virology 2017. June 2017, Madison, USA.
  14. Murayama A, Yamada N, Momose H, Matsuoka S, Hamaguchi I, Toyota K, Wakita T, Kato T. Establishment of HBV reference panel for evaluation of diagnostic kits for detection and quantification of HBV DNA and HBsAg. 2017 International Meeting, Molecular Biology of Hepatitis B Virus. Oct. 3-6, 2017, Washington DC, USA.
  15. Murayama A, Yamada N, Momose H, Matsuoka S, Hamaguchi I, Toyota K, Wakita T, Kato T. Evaluation of in vitro diagnostic kits for detection and quantification of HBV DNA and HBsAg using HBV reference panel. The Liver Meeting 2017, AASLD's Annual Meeting, Oct. 20-24, 2017, Washington DC, USA.
  16. Murayama A, Yamada N, Suzuki R, Wakita T, Kato T. Establishment of novel hepatitis C virus cell culture system using a genotype 2a strain with minimum modifications. The Liver Meeting 2017, AASLD's Annual Meeting, Oct. 20-24, 2017, Washington DC, USA.
  17. Nitta S, Murakawa M, Asahina Y, Kato T. The analysis of NS5A Resistance-Associated Substitutions (RAS): In vitro study of NS5A recombinant hepatitis C in infectious cell culture system for various RAS detected after treatment failure in chronic hepatitis C patients. The Liver Meeting 2017, AASLD's Annual Meeting, Oct. 20-24, 2017, Washington DC, USA.

18. Ohashi H, Nakajima S, Kim S, Suzuki R, Aizaki H, Fukasawa M, Kamisuki S, Sugawara F, Ohtani N, Wakita T, Watashi K. Novel Crosstalk of Xenobiotic Response with Lipid Metabolism Regulates the Host Permissiveness to Hepatitis C Virus Production. 24th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. 2017.9.25-28. Cape Cod (USA).
19. Okamura H, Nio Y, Watashi K, Wakita T, Hijikata M. Fatty acids with certain carbon chain length can support hepatitis B virus production. 2017 International HBV Meeting The Molecular Biology of Hepatitis B Viruses. 2017 International HBV Meeting The Molecular Biology of Hepatitis B Viruses. 2017/8/3-7. Washington DC (USA).
20. Okamura H, Sasai M, Nio Y, Watashi K, Wakita T, Hijikata M. Modulation of HBV life cycle by sulforaphane. 2017 International HBV Meeting The Molecular Biology of Hepatitis B Viruses. 2017/8/3-7. Washington DC (USA).
21. Okumura A, Ito K, Watashi K, Takeuchi J, Inoue R, Suzuki S, Sakamoto K, Okutsu S, Umezawa K, Wakita T, Yoneda M. Antiviral effect of bile acid derivatives on hepatitis B virus infection. 2017 International HBV Meeting The Molecular Biology of Hepatitis B Viruses. 2017/8/3-7. Washington DC (USA).
22. Shimizu H. A cluster of cases with acute flaccid myelitis coincident with an enterovirus D68 outbreak in Japan, 2015. A respiratory “neurovirulent”? enterovirus. International Workshop on Laboratory Diagnosis for Enterovirus, Taipei, Taiwan, 23 April, 2018
23. Shimizu H. Enterovirus D68 outbreak in Japan during autumn 2015, The 3rd Symposium on Research and Quality Control of Vaccines. Beijing, China, 8 May, 2017
24. Shimizu H. Nationwide survey of acute flaccid paralysis in August–December 2015 during an enterovirus D68 outbreak in Japan. U.S.-Japan Cooperative Medical Sciences Program Viral Diseases Panel Meeting, Shenzhen, China, 8 January, 2018
25. Shimizu H. sIPV introduction in Japan; Lessons learned. The 20<sup>th</sup> Polio Research Committee Meeting, Tokyo, Japan, 31 October-1 November, 2017
26. Shimizu H. Surveillance and Laboratory Diagnosis of Enterovirus Infections in Vietnam and Japan. A Joint Meeting on Collaborative Research between NIID and NIHE, Tokyo, 22 August, 2017
27. Shimizu H. Understanding of the pathogenesis of enterovirus 71 infection based on the identification of the receptors. The 20<sup>nd</sup> International Conference on Emerging Infectious Diseases (EID) in the Pacific Rim, Shenzhen, China, 8 January, 2018
28. Shiromoto F, Aly HH, Watashi K, Hoshino SI, Kato T, Chayama K, Wakita T. HBV-X and the balance between degradation or inflammation. 2017 International Meeting, Molecular Biology of Hepatitis B Virus. Oct. 3-6, 2017, Washington DC, USA.
29. Suzuki R, Yato K, Tosaka T, Su Su Hmwe, Matsuda M, Watashi K, Aizaki H, Fukasawa M, Matsuura Y, Wakita T. Structural proteins of hepatitis C virus Genotype 3a S310 strain permit claudin-1-independent entry. 24th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Cape Cod, USA. 2017. 9. 25-28.

30. Tenge VR, Murakami K, Karandikar U, Ramani S, Ettayebi K, Ayyar BV, Zeng X, Yu X, Neill FH, Atmar RL and Estes MK. Bile-driven replication of GII.3 human norovirus in human intestinal enteroids. NoroCORE Final Showcase Meeting, March 2018, Atlanta, USA.
31. Tsukuda S, Watashi K, Kojima S, Wakita T. Identification of a new class of HBV and HDV entry inhibitor, proanthocyanidin. AASLD The Liver Meeting 2017. 2017/10/20-24. Washington DC, USA.
32. Utsumi Y, Lusida MI, Dinana Z, Wahyuni RM, Yamani LN, Juniastuti, Soetjipto, Matsui C, Deng L, Abe T, Doan YH, Fujii Y. Annual Meeting of the Japanese Society for Virology, Osaka, Japan. 2017 October 24-26. Poster presentation
33. 32. Wahyuni RM, Utsumi T, Doan YH, Dinana Z, Fujii Y, Soegijanto S, Juniastuti, Yamani LN, Matsui C, Deng L, Abe T, Soetjipto, Lusida MI, Katayama K, Shoji I. Novel equine-like G3 rotavirus strains among children in Surabaya, Indonesia, 2015-2016. Annual Meeting of the Japanese Society for Virology, Osaka, Japan. 2017 October 24-26. Poster presentation.
34. Yasumoto J, Kasai H, Yoshimura K, Otoguro T, Watashi K, Wakita T, Yamashita A, Tanaka T, Takeda S, Moriishi K. Involvement of cell-death inducing DFF45-like effectors in HBV replication. 5th JAPAN-TAIWAN-KOREA HBV Research Symposium 2017. 2017/4/8-9. Tokyo (Japan).
2. 国内学会
- 1) 李天成、吉崎佐矢香、網康至、須崎百合子、団海燕、芳賀慧、高橋利明、三代俊治、武田直和、脇田隆字。A Potential Zoonotic Infection of G5 Hepatitis E Virus Produced by Reverse Genetics System。第 64 回日本ウイルス学会学術集会、2017 年 10 月大阪。口頭発表
- 2) 李天成、白慧敏、吉崎佐矢香、網康至、須崎百合子、団海燕、芳賀慧、高橋利明、三代俊治、武田直和、脇田隆字。ラット E 型肝炎ウイルス持続感染ヌードラットをモデルにした抗ウイルス薬の評価。第 160 回日本獣医学会学術集会、2017 年 9 月鹿児島。口頭発表
- 3) 清水博之、第 65 回日本ウイルス学会学術集会、大阪、2017 年 10 月 24 日～26 日 (ポスター)
- 4) YEN HAI DOAN、第 65 回日本ウイルス学会学術集会、大阪、2017 年 10 月 24 日～26 日 (ポスター)
- 5) 村松正道 HBV cccDNA formation by a host repair factor, FEN1 北大遺伝子病制御研究所「感染、免疫、がん、炎症」北大鈴木章ホール 2018.3.26.招待講演
- 6) 村松正道 B 型肝炎ウイルス感染を制御する宿主因子の探索と解析 平成 29 年度 AMED B 型肝炎創薬実用化等研究事業キックオフミーティング 平成 29 年 5 月 31 日 口頭発表
- 7) 前田有美恵、大場舞、岡智一郎、安藤隆幸、荒畑沙織、池ヶ谷朝香、高木弘隆、小郷尚久、小和田和宏、川森文彦、浅井章良 ノロウイルス感染制御を指向したテアフラビン類と複素環カルボキサミド誘導体の活性評価 第 50 回東海薬剤師学術大会、愛知、2017
- 8) Oka T, Stoltzfus GT, Zhu C, Jung K, Wang Q, Saif LJ Attempts to grow human noroviruses and a sapovirus in vitro

第 65 回日本ウイルス学会学術集会, 大阪, 2017

9) 下池貴志、第 65 回日本ウイルス学会学術集会 大阪国際会議場 (2017. 10. 24-26)

10) 加藤孝宣, 脇田隆宇. 培養細胞由来の不活化ウイルス粒子を用いた HCV ワクチンの開発. 第 53 回日本肝臓学会総会. 広島, 2016. 6. 8-9.

11) 加藤孝宣, 山田典栄, 村山麻子, 脇田隆宇. 検体パネルを用いた HBV DNA および HBs 抗原検出用体外診断薬の評価. 第 53 回日本肝臓学会総会. 広島, 2016. 6. 8-9.

12) 村山麻子, 山田典栄, 脇田隆宇, 加藤孝宣. ビタミン D とその誘導体による C 型肝炎ウイルス増殖阻害活性の解析. 第 53 回日本肝臓学会総会. 広島, 2016. 6. 8-9.

13) 政木隆博, 加藤孝宣, 松浦知和, 脇田隆宇. C 型肝炎ウイルスは microRNA-induced silencing complex を標的として宿主 microRNA 機能を抑制する. 第 53 回日本肝臓学会総会. 広島, 2016. 6. 8-9.

14) 新田沙由梨, 村川美也子, 永田紘子, 佐藤綾子, 三好正人, 角田知之, 浅野侑, 金子俊, 大谷賢志, 北畑富貴子, 東正新, 柿沼晴, 中川美奈, 加藤孝宣, 朝比奈靖浩, 渡辺守. HCV-NS5A 阻害剤使用に関連する薬剤耐性変異ウイルスとその特徴. 第 53 回日本肝臓学会総会. 広島, 2016. 6. 8-9.

15) 山田典栄, 四柳 宏, 加藤孝宣. エンテカビル耐性症例における新規耐性変異の同定と薬剤感受性の評価. 第 53 回日本肝臓学会総会. 広島, 2016. 6. 8-9.

16) Aly HH, Shiromoto F, Kato T, Watashi K, Chayama K, Wakita T. In response to inflammatory response HBV-X regulates its own mRNA stability by inducing Ski2

expression and RNA exosome activity. 第 13 回広島肝臓プロジェクト研究センターシンポジウム, 広島, 2017. 7. 1.

17) Shiromoto F, Aly HH, Watashi K, Hoshino SI, Kato T, Chayama K, Wakita T. HBV exploit Ski2/RNA complex to degrade cytokines and suppress inflammation. 第 65 回日本ウイルス学会学術集会, 大阪, 2017. 10. 24-26.

18) アリフセイン, 渡土幸一, 渡邊則幸, 茶山一彰, 加藤孝宣, 脇田隆宇. HBV-X regulates its own mRNA half life to evade apoptosis. 第 42 回日本肝臓学会西部会, 福岡, 2017. 11. 30 – 12. 1.

19) 村山麻子, 鈴木亮介, 脇田隆宇, 加藤孝宣. HCV の遺伝子型 2a のウイルス株を用いた新規 HCV 感染増殖系の樹立. 2017 年度生命科学系学会合同年次大会, 神戸, 2017. 12. 6-9.

20) 鈴木亮介, 芳賀慧, 松田麻未, 高崎智彦. CRISPR スクリーニングを用いたフラビウイルス感染に必須な宿主因子の同定. 第 52 回日本脳炎ウイルス生態学研究会, 沖縄, 2017 年 5 月 19-20 日.

21) Imagawa T, Ito M, Takabayashi S, Tanaka K, Matsuda M, Suzuki R, Takasaki T, Suzuki T. Development of a Zika virus infection model in common marmosets. 日本ウイルス学会第 65 回学術集会, 大阪, 2017 年 10 月 24-26 日

22) Suzuki R, Matsuda M, Shimoike T, Watashi k, Aizaki H, Kato T, Suzuki T, Wakita T. Phosphorylation of protein kinase R and translational suppression by NS5B protein of hepatitis C virus. 日本ウイルス学会第 65 回学術集会, 大阪, 2017 年 10 月 24-26 日.

23) Yato K, Matsuda M, Watanabe N, Nakajima S, Fujimoto A, Watashi K, Aizaki H, Kato T, Tamura K, Wakita T, Suzuki R. Generation of hepatitis C virus

vaccine antigen based on Japanese encephalitis virus subviral particles. 日本ウイルス学会第 65 回学術集会, 大阪, 2017 年 10 月 24-26 日.

24) 鈴木哲朗, 鈴木亮介. C 型肝炎ウイルスのゲノムパッケージング機構. 第 3 回デザイン生命工学研究会, 沖縄, 2018 年 3 月 9-10 日.

25) 矢藤慶悟, 松田麻未, 鈴木亮介. 日本脳炎ウイルスを利用した抗 C 型肝炎ウイルス 2 価ワクチン抗原の作製. 第 3 回デザイン生命工学研究会, 沖縄, 2018 年 3 月 9-10 日.

26) 松田麻未, 矢藤慶悟, 鈴木哲朗, 鈴木亮介. リバースジェネティクスによる一回感染性ウイルスの作製と利用. 第 3 回デザイン生命工学研究会, 沖縄, 2018 年 3 月 9 日.

27) 外山政明, 濱崎隆之, 岡本実佳, 渡士幸一, 脇田隆字, Ashoke Sharon, 馬場昌範. 抗 HBV 効果を有する Neplanocin A 誘導体の作用機序解析. 第 27 回抗ウイルス療法学会学術集会・総会. くまもと県民交流館パレア. (2017/5/18-20) 口頭発表

28) 渡士幸一, 小泉吉輝, 大橋啓史, 中嶋翔, 田中靖人, 脇田隆字, Alan S. Perelson, 岩見真吾. 抗肝炎ウイルス薬の薬効・変異頻度定量評価系の開発と多剤併用の意義. 第 27 回抗ウイルス療法学会学術集会・総会. くまもと県民交流館パレア. (2017/5/18-20) 口頭発表

29) の薬効・変異頻度定量評価系の開発と多剤併用の意義. 第 27 回抗ウイルス療法学会学術集会・総会.

30) 脇田隆字, Alan S. Perelson, 岩見真吾. 抗肝炎ウイルス薬の薬効・変異頻度定量評価系の開発と多剤併用の意義. 第 27 回抗ウイルス療法学会学術集会・総会.

31) 渡士幸一, 小泉吉輝, 大橋啓史, 中嶋翔, 田中靖人, 脇田隆字, Alan S. Perelson, 岩見真吾. 抗肝炎ウイルス薬の薬効・変異頻度定量評価系の開発と多剤併用の意義. 第 27 回抗ウイルス療法学会学術集会・総会. くまもと県民交

流館パレア. (2017/5/18-20) 口頭発表

32) 青柳東代, 飯島尋子, Francesc Puig-Basagoiti, Zheng Xin, Yu Ting Kao, Gewaid E. Hossam, 在津拓馬, 松田麻未, 渡士幸一, 鈴木亮介, 政木隆博, 島田紀明, 加藤慶三, 坪田昭人, 三又絢子, 酒巻有里子, 市野瀬志津子, 和氣健二郎, 脇田隆字, 相崎英樹. C 型慢性肝炎のウイルス学的著効 (SVR) 後の肝実質細胞のオルガネラ異常の解析. 第 27 回抗ウイルス療法学会学術集会・総会. くまもと県民交流館パレア. (2017/5/18-20) 口頭発表

33) 渡士幸一, 九十田千子, 脇田隆字. B 型肝炎ウイルス培養系を用いた創薬研究. 第 53 回日本肝臓学会総会. 広島国際会議場リーガロイヤルホテル広島. (2017/6/8-9) 口頭発表

34) 伊藤清頭, 渡士幸一, 米田政志. 胆汁酸代謝調節機構を標的とした B 型肝炎ウイルス制御の試み. 第 53 回日本肝臓学会総会. 広島国際会議場リーガロイヤルホテル広島. (2017/6/8-9) 口頭発表

35) 相崎英樹, 渡士幸一, 鈴木哲朗, 政木隆博, 横山寛, 脇田隆字. HCV の肝星細胞への感染および肝星細胞活性化のメカニズム解析. 第 53 回日本肝臓学会総会. 広島国際会議場リーガロイヤルホテル広島. (2017/6/8-9) 口頭発表

36) 深野 顕人, 九十田 千子, 鈴木 亮介, 相崎 英樹, 村松 正道, 脇田 隆字, 小笠原 裕樹, 渡士 幸一. SLC10A1/NTCP のトラフィッキング制御を標的とした新規 B 型肝炎ウイルス感染阻害戦略. 日本薬学会第 138 年会. TKP 金沢カンファレンスセンター. (2018/3/25-28) 口頭発表

37) Aly HH, Shiromoto E, Watashi K, Kato T, Chayama K, Wakita T. HBV exploit Ski2/RNA complex to degrade cytokines and suppress inflammation. The 65th Annual

Meeting of the Japanese Society for Virology. Osaka International Convention Center. (2017.10.24-26) 口頭発表

38) Kao YT, Goto K, Aoyagi H, Hossam GE, Zheng X, Puig-Basagoiti F, Watashi K, Suzuki R, Yamagoe S, Dohmae N, Suzuki T, Okushin K, Tsutsumi T, Yotsuyanagi H, Moriya K, Koike K, Suzuki T, Wakita T, Aizaki H. Membrane protein, embryonic lethal, abnormal vision, drosophila-like 1, interacts with NS5A and involves in hepatitis C virus replication. The 65th Annual Meeting of the Japanese Society for Virology. Osaka International Convention Center. (2017.10.24-26) 口頭発表

39) Kasai H, Yasumoto J, Yamashita A, Tanaka T, Watashi K, Wakita T, Otoguro T, Moriishi K. The bidirectional interplay of hepatitis B virus and cell-death inducing DFF45-like effectors. The 65th Annual Meeting of the Japanese Society for Virology. Osaka International Convention Center. (2017.10.24-26) 口頭発表

40) Ohashi H, Nakajima S, Kim S, Fukasawa M, Suzuki R, Aizaki H, Sugawara F, Ohtani N, Wakita T, Watashi K. Novel crosstalk of Xenobiotic Response with Lipid Biosynthesis Pathway regulates the Host Permissiveness to the Hepatitis C Virus Production. The 65th Annual Meeting of the Japanese Society for Virology. Osaka International Convention Center. (2017.10.24-26) 口頭発表  
Fukano K, Tsukuda S, Suzuki R, Aizaki H, Wakita T, Ogasawara Y, Watashi K. Identification of a hepatitis B virus internalization inhibitor with a novel mode of action. The 65th Annual Meeting of the Japanese Society for Virology. Osaka International Convention Center. (2017.10.24-26) 口頭発表

41) Iwamoto M, Cai D, Sugiyama M, Suzuki R, Aizaki H, Ryo A, Ohtani N, Tanaka Y, Mizokami M, Wakita T,

Watashi K. Interaction of hepatitis B virus core protein with microtubules is important for the efficient capsid formation. The 65th Annual Meeting of the Japanese Society for Virology. Osaka International Convention Center. (2017.10.24-26) 口頭発表

42) Ueno M, Nogawa M, Siddiqui R, Watashi K, Wakita T, Kato T, Oda T, Ariumi Y. Broad antiviral activities of acidic polysaccharides isolated from marine algae. The 65th Annual Meeting of the Japanese Society for Virology. Osaka International Convention Center. (2017.10.24-26) ポスター発表

43) Rahayu R, Ohsaki E, Honda T, Okamoto T, Watashi K, Ueda K. Analysis of HBV life cycle in the HepG2 expressing human NTCP cell line. The 65th Annual Meeting of the Japanese Society for Virology. Osaka International Convention Center. (2017.10.24-26) ポスター発表

44) Okamura H, Nio Y, Watashi K, Wakita T, Hijikata M. Fatty acids synthesized from cellular fatty acid synthesis pathway play roles in hepatitis B virus production. The 65th Annual Meeting of the Japanese Society for Virology. Osaka International Convention Center. (2017.10.24-26) ポスター発表

45) Zheng X, Zaito T, Aoyagi H, Matsuda M, Watanabe N, Fujimoto A, Watashi K, Suzuki R, Fukuhara T, Matsuura Y, Ichinose S, Wake K, Suzuki T, Iijima H, Yokoyama H, Masaki T, Matsuura T, Tamura K, Wakita T, Aizaki H. Human hepatic stellate cells are permissive for hepatitis C virus infection/replication and play important roles in fibrosis. The 65th Annual Meeting of the Japanese Society for Virology. Osaka International Convention Center. (2017.10.24-26) ポスター発表

46) Aoyagi H, Iijima H, Puig-Basagoiti F, Zheng X, Kao



YT, Hossam GE, Matsuda M, Watashi K, Suzuki R, Masaki T, Aizawa N, Shimada N, Kato K, Tsubota A, Mimata A, Sakamaki Y, Ichinose S, Wake K, Wakita T, Aizaki H. Abnormal hepatocellular organelles remain to be observed in sustained virological response patients. The 65th Annual Meeting of the Japanese Society for Virology. Osaka International Convention Center. (2017.10.24-26) ポスター発表

47) Imai H, Dansako H, Ueda Y, Satoh S, Watashi K, Wakita T, Kato N. Screening of FDA-approved drugs activating cyclic GMP-AMP synthase promoter. The 65th Annual Meeting of the Japanese Society for Virology. Osaka International Convention Center. (2017.10.24-26) ポスター発表

48) Matsuda M, Yamanaka A, Yoshii K, Watashi K, Aizaki H, Konishi E, Takasaki T, Wakita T, Suzuki R. Establishment of a neutralization assay for multiple flaviviruses based on single-round infectious particles. The 65th Annual Meeting of the Japanese Society for Virology. Osaka International Convention Center. (2017.10.24-26) ポスター発表

49) 渡士幸一 B型肝炎ウイルス基礎研究・創薬研究の最近の知見. 衛生微生物技術協議会第38回研究会. 東京. (2017.6.28)

50) 渡士幸一 トランスポーターと肝炎ウイルス. 日本薬物動態学会第32回年会東京. 東京. (2017.11.30)

51) 渡士幸一 B型肝炎ウイルス培養系の構築から創薬研究へ. 日本薬学会第138年会. 金沢. (2018.3.28)

III. その他

1) 村松正道 AID・APOBEC ファミリーの腫瘍ウイルス感染病態における役割 肝疾患研究部セミナー国立国際医療研究センター1月17. 2018  
招待講演

2) 村松正道 AID/APOBECと腫瘍ウイルス 川口研セミナー 東京大学 医科学研究所 2017.11.17.

3) Suzuki R. Development of a neutralization assay for multiple flaviviruses based on single-round infectious particles. The 8th Informal Consultation on WHO GS and RR JE Laboratories in WPRO, Tokyo, Japan. 2017. 11. 21-22.

4) 加藤孝宣. 培養細胞を用いた肝炎ウイルス増殖系の構築とその応用. 第34回神奈川ウイルス肝炎セミナー, 横浜, 2017. 9.13.

5) Suzuki R. A neutralization assay for multiple flaviviruses using single-round infectious particles. U.S.-Japan Cooperative Medical Sciences Program (USJCMSP) 20th International Conference on Emerging Infectious Diseases (EID) in the Pacific Rim. Shenzhen, China. 2018. 1. 8-9.

6) 岡智一郎  
国立保健医療科学院 平成29年度  
短期研修 新興再興感染症技術研修講義  
下痢症ウイルス総論 II (サポウイルス)  
2017年10月17日 東京(村山庁舎)

7) 岡智一郎  
JICA 研修「ワクチン品質・安全性確保のための NRA 機能強化」研修講義「Rotavirus Vaccines」  
2018年1月18日 東京(村山庁舎)

- 8) 下池貴志、野島清子、脇田隆字、浜口功、岡田義昭.  
Chon エタノール方における 17%エタノール処理による  
HCV の変化の解析
- 9) 帖佐徹、吉田弘、滝澤剛則:環境水サーベイランス手法  
の中国への導入について 第 76 回日本公衆衛生学会平  
成 29 年 10 月 31-11 月 2 日 鹿児島市 ポスター発表
- 10) 吉田弘、筒井理華、堀田千恵美、小澤広規、滝澤剛  
則、中田恵子、世良暢之、濱崎光宏:環境水サーベイラン  
スによるポリオウイルス検出時の課題 第 76 回日本公衆衛  
生学会 平成 29 年 10 月 31-11 月 2 日 鹿児島市 ポスタ  
ー発表
- 11) 濱崎光宏、世良暢之、吉田弘:環境水中の腸管系ウイ  
ルス量と感染症発生动向調査事業の患者数との関連に  
ついて 第 76 回日本公衆衛生学会 平成 29 年 10 月 31-11  
月 2 日 鹿児島市 ポスター発表
- 12) 帖佐徹、吉田弘、板持雅恵、滝澤剛則、Zhang Yong,  
Xiaohui Hou、Zheng Huanying、Wang Haiyang、Tao  
Zexin :Collaboration study of environmental surveillance  
for polio since 2005 between Japan and China グローバ  
ルヘルス合同大会 2017 平成 29 年 11 月 24-26 日 東京  
口頭発表
- 13) 松岡由美子、岩永貴代、杉谷和加奈、矢坂貴子、阿  
蘇品早苗、西澤香織、吉田弘 熊本市環境総合センター  
における病原体検査の質管理の取り組み 2018 第 31 公  
衆衛生情報研究協議会 1 月 25-26 日 和光市 ポスター発  
表
- 14) 有田峰太郎. 宿主因子を標的とする抗エンテロウイル  
ス化合物の探索およびウイルス複製/宿主細胞への影響  
の解析. 日本薬学会第 137 回年会、シンポジウム「抗ウイ  
ルス感染症研究のフロンティア」～ウイルスと宿主の攻防  
～、仙台、2017. 3.26
- 15) 萩原圭、小谷治、岩田奈織子、長谷川秀樹、清水博  
之、永田典代. Clarification of a mechanism of  
SAFV-Induced demyelination in a mouse model. 感染マウ  
スモデルを用いたサフォードウイルスの脱髄病変形成メカ  
ニズムの解明.
- 16) 宮崎誠、斎藤博之、柴田ちひろ、YEN HAI DOAN、  
荒尾雄二郎、岩田奈織子、長谷川秀樹、清水博之、永田  
典代. エンテロウイルス D68 型感染後の弛緩性麻痺発現  
マウスモデルの構築.
- 17) 清水博之. エンテロウイルス D68 のウイルス学的性状,  
シンポジウム 2 急性弛緩性脊髄炎. 第 22 回日本神経感染  
症学会学術大会、北九州、2017 年 10 月 14 日.招待講演
- 18) 清水博之. 世界ポリオ根絶の現状と今後の課題. 衛生  
微生物技術協議会第 38 回研究会、東京、2017 年 6 月 27  
日
- 19) 福島慎二、中野貴司、清水博之、濱田篤郎. 日本人成  
人に対する不活化ポリオワクチン追加接種直後と 3 年後  
の中和抗体価. 第 91 回日本感染症学会総会・学術講演  
会・第 65 回日本化学療法学会学術集会 合同学会 2017  
年 4 月 6 日～8 日、東京
- 20) 渡土幸一 B型肝炎ウイルス基礎研究・創薬研究の最  
近の知見. 衛生微生物技術協議会第 38 回研究会. 東  
京. (2017.6.28)
- 21) 渡土幸一 トランスポーターと肝炎ウイルス. 日本薬物  
動態学会第 32 回年会東京. 東京. (2017.11.30)
- 22) 渡土幸一 B 型肝炎ウイルス培養系の構築から創薬研  
究へ. 日本薬学会第 138 年会. 金沢. (2018.3.28)
- 23) 安浦雅人、白土東子、守口匡子、藤巻真: EFA-NI  
バイオセンサを用いた実環境サンプル中のノロウイル  
ス様粒子検出, ケミカルセンサ研究会, 2017 年 6 月,

兵庫県

Meeting on Vaccine-preventable Diseases Laboratory  
Networks in the Western Pacific Region. WHO/WPRO,  
Manila, the Philippines, 26-27 September, 2017

24)清原知子, 石井孝司, 脇田隆宇, 佐竹正博. A型肝炎  
の血清疫学. 第21回日本ワクチン学会, 福岡. (2017年  
12月2, 3日)

25)吉田弘「改正感染症法における検査標準作業書と精  
度管理のあり方について」平成29年度 地域保健総合推  
進事業 地方衛生研究所全国協議会関東甲信静支部レフ  
ァレンスセンター連絡会議 平成29年10月11日千葉市  
招待講演及び講師

26)Murakami K, Tenge VR, Ettayebi K, Crawford SE,  
Ramani S, Zeng X, Atmar RL, Estes MK. Characterization  
of the active component in bile required for the replication  
of human norovirus GII.3 in human intestinal enteroids.  
第40回日本分子生物学会年会, 平成29年12月, 神戸  
ポートアイランド.

27)村上耕介. ノロウイルスの培養系-その現状. ウイルス性  
下痢症研究会第29回学術集会. 平成29年10月, 大阪  
健康安全基盤研究所 森ノ宮センター.

28)村上耕介. ノロウイルスと培養. 名古屋大学大学院医学  
研究科 大学院基盤医学特論. 平成30年1月, 名古屋  
大学大学院医学研究科.

29) 西村順裕 エンテロウイルス 71 型の受容体に関す  
る最新の知見. 第14回ウイルス学キャンプ, 湯河原市,  
2017.6.5

30)清水博之: 世界ポリオ根絶計画とポリオワクチン.  
知の市場・市民連携セミナー. 東京、2017年12月4日

31) Shimizu H. NIID Update. The 21<sup>th</sup> Polio Research  
Committee Meeting. Geneva, Switzerland, 4 May, 2018

32) Shimizu H. NIID Polio GSL activity, 2017. The 7<sup>rd</sup>