

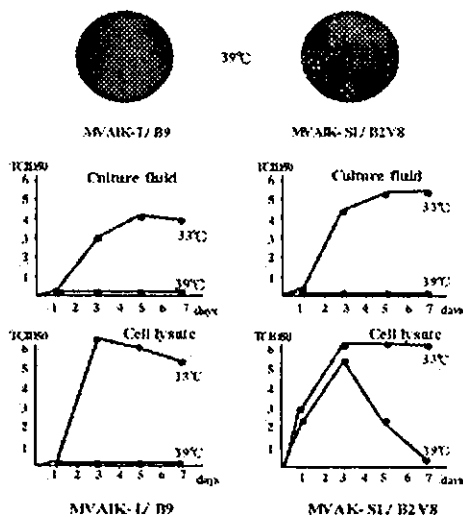
recombinant ウイルスを回収し、MVAIK-S/B2 (small plaque type), MVAIK-L/B2(large plaque type)とした。MVAIK-S/B2 を Vero 細胞に接種し、large plaque からウイルスをクローニングし Vero 細胞を用いて 33℃で 8 代継代し MVAIK-SL/B2V8 を得た。MVAIK-L /B2 は更に B95a 細胞を用い 33℃で 7 代継代し MVAIK-L/B9 を得た。回収したウイルスの Vero 細胞における 33℃、39℃での増殖能を比較し、N、P、M、F、H、L 領域の翻訳領域を PCR で増幅し塩基配列を決定した。

C. 研究結果

- 1) 細胞増殖能：alamerBlue™ を加えた各血清を含む培地、及び無血清培地における 1, 3, 5, 7 日目の蛍光強度を蛍光波長 590/544 で測定した。ニワトリ血清、豚血清を加えた培地、および無血清培地では従来の NCS を含む培地とほぼ同様な数値を示した。
- 2) 細胞形態：ニワトリ血清を含む培地、および無血清培地で増殖させた細胞は NCS 培地を用いた細胞と同様にとともにモノレイヤーな状態でボトルに付着した。一方、豚血清をもちいた培地では細胞の伸張が弱く、ボトルから剥離する傾向にあった。
- 3) AIK-C ウイルス増殖能：AIK-C ウイルス接種後 6 日目のウイルス力価はニワトリ血清入り培地、ならびに無血清培地では NCS 培地とほぼ同様の増殖能を示したが、豚血清を含んだ培地を用いた細胞は剥落が激しく、ウイルスは検出されなかった。
- 4) 温度感受性の保持：AIK-C 株は Edmonston 株を羊腎臓細胞に接種し 33℃培養で、small plaque cloning した後、ニワトリ胎児胚細胞に adaptation させ樹立したワクチン株である。従ってその生物学的性状として small plaque と 39℃で増殖しない温度感受性が特徴となる。MVAIK-L/B9 と MVAIK-SL/B2V8 の増殖能を比較して図 1 に示した。培養 1,3,5,7 日に培養上清と細胞成分に分け B95a 細胞で感染価を測定した。MVAIK-L/B9 は 33℃培養 3 日目から細胞内でウイルスは増殖し培養上清中にも産生されてくる。一方、39℃培養では細胞内、培養上清中にもウイルスは検出されず細胞変性効果も認められない。MVAIK-SL/B2V8 は 33℃では

同様にウイルスは増殖し、39℃でも細胞内には感染性ウイルスは産生され細胞変性効果も認められた。培養上清中にはウイルスは検出されなかった。

- 5) 塩基配列の変化：MVAIK-SL/B2V8, MVAIK-L/B9, Edmonston, AIK-C の 4 株の翻訳領域の塩基配列を比較した。MVAIK-L/B9 は 5 カ所の塩基配列の変異が認められ、4 カ所にアミノ酸の変異を伴っていた。N129, L371, L542 にアミノ酸の変異が認められいずれも親株である Edmonston 株のアミノ酸に変化していた。Genome position 12671 はアミノ酸の変異は伴わない silent mutation で Edmonston 株に戻っていた。MVAIK-SL/B2V8 は 13 カ所のアミノ酸変異を認め L2032 以外はすべて Edmonston 株に戻る back-mutation であった。L 領域に 11711(L826), 12671(L1146), 14651(L1806) にアミノ酸変異を伴わない silent mutation を認めた。MVAIK-L/B9 には envelop 蛋白の変異は認めなかったが MVAIK-SL/B2V8 には H338, F278, F453, F494 アミノ酸の変異を認めた。F278 は Phe に変異しており Large plaque cloning を行った B2V2 の時点で変異を認めていた。MVAIK-SL/B2V8 から F、H 発現プラスミドを構築して Vero 細胞に transfection して発現実験を行ったが細胞融合能には差が観察されなかった。MVAIK-SL/B2V8 と MVAIK-L/B9 は N129 の変異は共通して認められ MVAIK-SL/B2V8 には C134, P275, P439 の変異が認められた。



(図1) MVAIK-L/B9 と MVAIK-SL/B2V8 の 33℃、39℃におけるウイルス増殖

D. 考察

近年、ワクチン等生物製剤の製造に使用する生物由来原料の規制が厳格になり、特に BSE の流行以来、牛由来原料を使用しない方向で製造工程の見直しがなされている。生ウイルスワクチンの製造には通常、牛血清を添加した培地で培養する初代培養細胞が用いられており、可能ならば牛血清を用いない製法の確立が望まれている。ニワトリ血清、豚血清を用いた培地、および無血清培地でニワトリ胚細胞の細胞増殖能、ウイルス産生量を検討したところ、ニワトリ血清、無血清培地では従来の牛血清を用いた結果とほぼ同等の結果を得た。鳥類であるニワトリは生物種として牛よりもヒトから遠く、交差する感染因子も少ない可能性がある。また、プリオンの報告はない。比較的安価でもあり、小型であるので屋内飼育等による品質の管理も容易であると想像される。将来、麻疹ワクチン等のニワトリ胚細胞を用いるワクチンの製造工程に牛血清の代用としてニワトリ血清を用いる事も可能と思われる。また、無血清培地での製造もウイルス増殖量、性状の安定性からも可能性があると考えられた。一方、ワクチンで使用実績が有る唯一の株化細胞である Vero 細胞は無血清培地でも継代出来ることが知られている。しかし今回、Vero 細胞での継代により、AIK-C の親株である Edmonston 株への Back-

mutation が観察され、また弱毒マーカーと考えられる温度感受性、small plaque を規定する遺伝子に変化が観察された。これらから Vero 細胞での培養はウイルスの性状に影響を与えることが考えられ、麻疹ワクチン製造には適切でない可能性が考えられた。

E. 結論

ニワトリ血清を含む培地、ならびに無血清培地によるニワトリ胚初代培養細胞は麻疹ワクチンの製造に使用できる可能性がある。一方、無血清培地で培養した Vero 細胞は麻疹ワクチンの製造には適切でない可能性がある

F. 健康危険情報

北里研究所病原体等安全管理規定に従って行った。

G. 研究発表

1. 論文

- 1) Mgone, C.S., Mgone, J.M., Takasu, T., Miki, K., Kawanishi, R., Asuo, P.G., Kono, J., Komase, K., Alpers, M.P. 2003. Clinical presentation of subacute sclerosing panencephalitis in Papua New Guinea. *Trop Med Int Health*. Mar;8(3):219-27.
- 2) Takasu, T., Mgone, J.M., Mgone, C.S., Miki, K., Komase, K., Namae, H., Saito, H., Kokubun, Y., Nishimura, T., Kawanishi, R., Mizutani, T., Markus, T., Kono, J., Asuo, P. G., and Alpers, M. P. 2003. A continuing high incidence of subacute sclerosing panencephalitis (SSPE) in the Eastern Highlands of Papua New Guinea. *Epidemiology and Infection*. 131:887-898.
- 3) Kumada, A., Komase, K., and Nakayama, T., 2004. Recombinant measles AIK-C strain expressing current wild-type hemagglutinin protein. *Vaccine*, 22 (3-4):309-316.

2. 学会発表

- 1) GFP 遺伝子挿入 AIK-C を用いた麻疹中和抗体測定法、藤野元子、中川正治、中山哲夫、新庄正宣、駒瀬勝啓、第 50 回日本ウイルス

- 学会学術集会・総会、札幌、2002/10/16-18
- 2) 麻疹ウイルスワクチン株、AIK-C を基盤にした多価ワクチンの可能性、駒瀬勝啓、飯嶋益巳、第6回日本ワクチン学会学術集会・総会、千葉、2002/11/30-12/1 麻疹ウイルスのN蛋白の解析、飯嶋益巳、駒瀬勝啓、第51回日本ウイルス学会、学術集会、総会、平成15年10月27日～29日 京都
 - 3) コットンラット動物モデルにおけるP蛋白変異麻疹ウイルス株の解析、芳賀猛、村山丹穂、篠原明男、越本知大、駒瀬勝啓、第51回日本ウイルス学会、学術集会、総会、平成15年10月27日～29日 京都
 - 4) 麻疹ウイルス野生株の温度感受性、藤野元子、吉田菜穂子、上島肇、駒瀬勝啓、中山哲夫、第51回日本ウイルス学会、学術集会、総会、平成15年10月27日～29日 京都
 - 5) 組換え麻疹ウイルスのVero細胞への馴化、上島肇、吉田菜穂子、藤野元子、駒瀬勝啓、中山哲夫、第51回日本ウイルス学会、学術集会、総会、平成15年10月27日～29日麻疹ウイルスのN蛋白の解析、飯嶋益巳、駒瀬勝啓、第52回日本ウイルス学会、学術集会、総会、平成16年11月21日～23日 横浜
 - 6) 麻疹ウイルス野生株の高温での増殖能、藤野元子、吉田菜穂子、飯嶋益巳、駒瀬勝啓、中山哲夫、第52回日本ウイルス学会、学術集会、総会、平成16年11月21日～23日 横浜
 - 7) ムンプスウイルス野生株の遺伝子型による細胞融合の差、吉田菜穂子、藤野元子、駒瀬勝啓、中山哲夫、第52回日本ウイルス学会、学術集会、総会、平成16年11月21日～23日 横浜

H. 知的財産権の出願、登録状況

1. 特許取得；なし
2. 実用新案登録；なし
3. その他；なし

牛血清を使用しない麻しんワクチン及びおたふくかぜワクチン製造に関する研究

分担研究者 末原章宏 （武田薬品工業株式会社）
協力研究者 岩本好司 山下利明 （武田薬品工業株式会社）

研究要旨 麻しんワクチン及びおたふくかぜワクチン製造に用いる初代ニワトリ胚細胞及び風しんワクチン製造に用いる初代ウサギ腎細胞の培養に、無血清培地〔VP-SFM、Opti-SFM、Opti-MEM〕を用いたとき、初代ニワトリ胚細胞で細胞培養が可能であった。麻しんウイルス（シュワルツ FF-8 株）の増殖性は、無血清培地とウシ血清添加培地で差のないことが確認された。これらの培養細胞から得た麻しんウイルスの遺伝子塩基配列の比較を行った結果、N 領域は継代 0 代から 5 代まで、いずれの場合も変異は認められなかった（H、F 領域未確認）。また、同様におたふくかぜウイルス（鳥居株）の遺伝子塩基配列の比較を行った結果、F、SH および HN 領域は継代 0 代から 3 代まで、いずれの場合も変異は認められず、麻しんワクチン及びおたふくかぜワクチン製造に無血清培地適用の可能性が示唆された。しかしながら、生ワクチン製造に無血清培地を導入するには、他のウイルス性状試験、継代を増やしたときのウイルス及び製剤の安定性について更なる検討が必要と考えられた。

A.研究目的

乾燥弱毒生麻しんワクチン、乾燥弱毒生風しんワクチン及び乾燥弱毒生おたふくかぜワクチンの製造工程で、出発材料である初代培養細胞を増殖させる際に、牛血清、トリプシンが用いられている。これら生物由来原料については、原料の製造段階で迷入ウイルスなどの否定試験やγ線照射処理などが行われているが、更なる安全性向上を目的として、“牛血清を使用しない生ワクチン製造の可能性について検討することとした。

B.研究方法

初年度は、無血清培地による細胞培養及びウイルス培養の可能性を検討するため、現行製造方法と同様に、トリプシン消化して得たニワトリ胚細胞及びウサギ腎細胞を、インビトロジェン社製の市販無血清培地〔VP-SFM、Opti-SFM、Opti-MEM〕で浮遊し、37℃で培養して細胞状態を観察した。増殖が確認された細胞を用いワクチン株ウイルスを接種し、現行の製造方法と同様に 199 液に交換してウイルス培養を実施した。

また、ブタ膵臓由来のトリプシンを使用しな

い細胞培養及びウイルス培養の可能性を検討するため、細胞採取に適した 10 日齢卵と 11 日齢卵のニワトリ胚を用い、ホモジナイザー破碎処理の検討として、回転数 10,000rpm×破碎時間 60sec、120sec、180sec、11 日齢卵の胎児を用い、回転数 5,000rpm、10,000rpm、15,000rpm×10sec の条件でホモジナイザー破碎して得られた細胞を、VP-SFM、Opti-SFM、Opti-MEM で浮遊後、培養容器に入れ、37℃で培養して細胞状態を観察を行った。また、回転数 5,000rpm×10sec で破碎して得られた 11 日齢卵と 12 日齢卵の胎児細胞を、VP-SFM、Opti-SFM、Opti-MEM で浮遊後、培養容器に入れ、37℃で培養して細胞状態を観察し、増殖が確認された細胞に麻しんワクチン株ウイルスを接種し、199 液に交換してウイルス培養を実施した。

次年度は、Opti-SFM を使用することで、ニワトリ胚細胞培養及びウイルス培養が可能であるとの初年度研究成果に基づき、細胞培養で添加する牛血清の有無により、その培養細胞で得た麻しんウイルス（シュワルツ FF-8 株）の遺伝子塩基配列 N 領域に変異を起し得るかを調査するため、ウイルス培養を 5 代まで継代し、継代開

始時、継代 3 代及び継代 5 代のウイルスを RNA 採取用試料とし、分光光度計を用いて純度ならびに精製量を測定した。TimeSaver cDNA Synthesis Kits™ を用い、N 領域 RNA の 3'側に相補的なプライマーを使用した逆転写反応により cDNA を作製した。LA Taq ポリメラーゼを用い PCR 法により N 領域の DNA を増幅させ、遺伝子塩基配列解析用試料を作製した。これらの試料をプライマーウォーキング法により、シーケンシングを行い塩基配列の決定を行った。更に、DNASIS 解析ソフトを使用して得られた塩基配列の比較検討を実施した。

最終年度は、麻しんワクチンと同様にニワトリ胚培養細胞で培養するおたふくかぜウイルス（鳥居株）について、遺伝子塩基配列 HN、SH および F 領域に変異を起し得るかを調査することとした。同様に Opti-SFM を用いて、36~38℃ で 3 日間培養したニワトリ胚培養細胞におたふくかぜウイルス株を接種して 29~31℃ で 8 日間培養する継代を 3 代行い、継代開始時及び継代 3 代のウイルスを RNA 用試料とした。継代開始時、継代 3 代のウイルスから常法に従い RNA を精製し、分光光度計を用いて純度ならびに精製量を測定し、続いて RT-PCR により得られた PCR 産物を遺伝子塩基配列解析用試料とした。これら試料をプライマーウォーキング法を用いてシーケンシングを行い塩基配列の決定を行った。更に、DNASIS 解析ソフトを使用して得られた塩基配列の比較検討を実施した。

C. 研究結果

1. 牛血清を使用しない細胞培養及びウイルス培養の検討

1) ニワトリ胚細胞における無血清培地(Opti-SFM 培地)での細胞培養とウイルス培養

培養 2 日後に容器内の約 10% に細胞が接着し、培養 6 日後には約 50%~70% に増殖した。また、細胞の状態は良好であった。培養 6 日後の細胞に麻しんワクチン株ウイルスを接種し、翌日、199 液に交換し、以後 7 日間ウイルス培養し、集液後、液中のウイルス含量を測定した結果、集液時の細胞状態も良好で、麻しんウイルス特有の

細胞病変が観察され、測定したウイルス含量値は 4.2~5.9 log TCID₅₀/0.5mL であった。

2) ニワトリ胚細胞における各種無血清培地での細胞培養とウイルス培養

各種無血清培地によるニワトリ胚細胞培養結果を表 1 に示した。VP-SFM 培地は、培養 1 日後に容器内の約 75% に細胞が接着し、2 日後には約 100% に増殖していた。また、Opti-SFM 培地も同様に、培養 1 日後に容器内の約 75% に細胞が接着し、2 日後には約 100% に増殖していた。細胞状態はいずれの培地も良好であった。一方、Opti-MEM 培地は、培養 1 日後に容器内の約 75% に細胞が接着したが、2 日後でも約 75% 程度の増殖であり、前者に比べ増殖が低い傾向であったが、細胞状態は良好であった。しかし、ウサギ腎細胞では細胞培養ができなかった（成績未記載）。

これら培地で培養した培養 1 日後の細胞に麻しんワクチン株ウイルスを接種し、199 液に交換してウイルス培養を実施した結果、集液時の細胞状態はいずれの培地も良好で、麻しんウイルス特有の細胞病変が観察されたが、ウイルス含量試験は実施しなかった。

2. トリプシンを使用しない細胞培養及びウイルス培養の検討

1) ホモジナイザー破砕処理条件の設定

ホモジナイザーによる細胞採取法として、ニワトリ胎児を用い、胎児日齢と破砕条件について検討した。表 2 に示したように、回転数 10,000rpm において、使用した胎児の日齢を比較すると、いずれの破砕時間も、Opti-SFM 培地による培養 2 日後の容器内の細胞接着量は 11 日齢卵群が良く、7 日間の培養で高い細胞増殖が確認されたことから、11 日齢卵胎児が適していると思われた。

また、破砕時間はいずれの日齢も、60sec. で得た細胞の培養結果が良かったことから短時間が良いと思われた。上記の検討結果より、11 日齢卵胎児を用い、処理時間を更に短く 10 秒としたときの回転数の検討を行った結果、回転数も低いほうが細胞増殖性がよい傾向にあり、無血清培地の種類は VP-SFM、Opti-SFM で増殖性がよ

かった (表 3)。

2) ホモジナイザー破砕で採取した細胞でのワクチン株ウイルス培養

上記結果に基づき、5,000rpm×10sec.の破砕条件で、11日齢卵及び12日齢卵胎児から採取した細胞の細胞培養とワクチンウイルスの培養を実施した結果、11日齢卵と12日齢卵胎児の日齢差の比較は、細胞培養したときの接着及び増殖に差はみられなかったが、培養した細胞状態(汚さ)が異なり、12日齢卵胎児より11日齢卵胎児を使用するのが良いと思われた。また、培養液の違いによる接着及び増殖に差が見られないことから、いずれの培養液も使用は可能であると思われた。

次に、11日齢卵胎児2日培養細胞にそれぞれ、麻しんワクチン株ウイルス及びおたふくかぜワクチン株ウイルスを接種し、9日培養後の細胞の状態を観察した結果、いずれの培地においても培養日数が進むに従い、劣化が顕著であった。また、12日齢卵胎児2日培養細胞に、おたふくかぜワクチン株ウイルスを接種し、9日培養後の細胞の状態を観察した場合も同様に、いずれの培地においても培養日数が進むに従い、劣化が顕著であった。その結果を表4に示した。

3. 麻しんウイルスの遺伝子塩基配列解析

牛血清添加による培養細胞で得た麻しんウイルスのN領域を含む1775塩基の決定を行った結果、継代開始時及び継代5代の塩基配列に相違は認められなかったが、継代3代において3'末端のポリA内に一塩基アデニンが挿入される変異が認められた。一方、牛血清無添加による培養細胞で得た麻しんウイルスのN領域を含む1775塩基の決定を行った結果、継代開始時、継代3代及び継代5代の塩基配列に相違は認められなかった。

4. おたふくかぜウイルスの遺伝子塩基配列解析

牛血清添加による培養細胞で得たおたふくかぜウイルスの遺伝子のF、SHおよびHN領域を含む3946塩基の決定を行った結果、継代開始時及び継代3代の塩基配列に相違は認められなかった。一方、牛血清無添加による培養細胞で得たおたふくかぜウイルスの遺伝子についても同

様に、F、SHおよびHN領域を含む3946塩基の決定を行った結果、継代開始時及び継代3代の塩基配列に相違は認められなかった。

D. 考察

牛血清を使用しない新たなワクチン製造方法として、市販されている無血清培地を使用して牛血清を使用しない製造方法とトリプシンを使用しない製造方法を初年度のテーマとして検討した結果、播種する細胞数を調整しなかったため、実験によりバラツキがあったものの、ニワトリ胎児由来の細胞は無血清培地を使用することで、細胞培養とその後のウイルス培養が可能で、現行の牛血清を用いた培養細胞と同等であったことより、麻しんワクチン製造の可能性が示唆された。

また、おたふくかぜワクチンも同じ細胞を同様の方法で使用する製造方法であることから、ワクチン製造は可能であるものと推測されたが、ウサギ腎細胞を使用する風しんワクチンについては、細胞培養自体ができなかったことから、現状においてワクチン製造への適用は困難と考えられた。

トリプシンの代わりに、ニワトリ胎児をホモジナイザー処理法を検討した結果、無血清培地での培養可能な細胞が得られることが確認された。しかし、得られた細胞を、培養して観察すると、細胞の状態が、トリプシン消化法で得た細胞と多少異なり、ウイルス培養期間中の細胞維持が不安定であり、ウイルス培養に必要な培養日数が得られずウイルス増殖が確認できなかった。これは、トリプシン消化では採取されない骨細胞等の影響、あるいは、ホモジナイザー破砕による物理的な要因、さらには、培地に起因するものか今回の検討からは明らかにできなかった。トリプシン使用しない生ワクチンの製造方法を確立するには、ホモジナイザーの破砕条件あるいは化学的処理方法を含めた細胞の採取方法の検討及び採取した細胞の培養条件、ウイルスの培養条件の検討を要することより、テーマとして保留することとした。

次年度のテーマとして、牛血清添加培地で培

養したニワトリ胚培養細胞から得られた麻しんウイルスと無血清培地で培養したニワトリ胚培養細胞から得られた麻しんウイルスの遺伝子 N 領域塩基配列の比較を行った。牛血清添加培養ウイルスの継代 3 代において 3'末端のポリ A 内に一塩基アデニンが挿入される変異が認められたが、変異の位置が N 領域の末端であること及び継代 5 代の場合は、継代開始時と同じであったことから、この 3'末端のポリ A 内に一塩基アデニンの挿入は解析中の解析エラーであると考えられ、牛血清添加培養の当該ウイルス株の N 領域は、継代開始時から継代 5 代まで変異は生じていないものと判断された。

一方、無血清培地 (Opti-SFM) 培養ウイルスの継代開始時、継代 3 代及び継代 5 代に変異はなかったことから、ニワトリ胚細胞培養で添加する牛血清の有無は、麻しんウイルス (シュワルツ FF-8 株) の培養において、N 領域の遺伝子塩基配列には影響しないことが確認された。

最終年度のテーマとして牛血清添加培地で培養したニワトリ胚培養細胞から得られたおたふくかぜウイルスと無血清培地で培養したニワトリ胚培養細胞から得られたおたふくかぜウイルスの遺伝子塩基配列 F、SH および HN 領域の比較を行った。いずれの場合も継代開始時、継代 3 代に変異はなかったことから、ニワトリ胚細胞培養で添加する牛血清の有無は、おたふくかぜウイルス (鳥居株) の培養において、F、SH および HN 領域の遺伝子塩基配列には影響しないことが確認された。F および HN 領域は、ウイルスのエンベロープ上に位置し抗原性ならびに感染性に関与するたん白質をコードする領域であることから、継代開始時と継代 3 代の抗原性ならびに感染性に影響しないことが示唆された。

しかしながら、生ワクチン製造に無血清培地を導入するには、麻しんウイルスの H 領域及び F 領域の継代による遺伝子塩基配列の解析、おたふくかぜウイルスの 3 代を超えた継代による遺伝子塩基配列の解析、他のウイルス性状試験及び製剤の安定性について更なる検討が必要と考える。

E. 結論

1. ニワトリ胚細胞は無血清培地で培養が可能であり、麻しんウイルス及びおたふくかぜウイルスの増殖性も良好であった。
2. ニワトリ胚細胞を消化するトリプシンの使用を止めることは、現時点で困難と考えられた。
3. 継代培養した麻しんウイルス (シュワルツ FF-8 株) の N 領域の遺伝子塩基配列は、無血清培地と牛血清を用いた場合でウイルス遺伝子に変異のないことを確認した。
4. 継代培養したおたふくかぜウイルス (鳥居株) の F、SH および HN 領域の遺伝子塩基配列は、無血清培地と牛血清を用いた場合でウイルス遺伝子に変異のないことを確認した。
5. 牛血清を使用しない製造方法として、麻しんワクチン及びおたふくかぜワクチンの製造の可能性が示唆されたが、麻しんウイルスの H 領域及び F 領域の継代による遺伝子塩基配列の解析、おたふくかぜウイルスの 3 代を超えた継代による遺伝子塩基配列の解析、他のウイルス性状試験及び製剤の安定性について更なる検討が必要と考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表
なし。
2. 学会発表
なし。

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
予定なし。
2. 実用新案登録
予定なし。
3. その他
特記なし。

刊行物研究成果の刊行に関する一覧表

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	頁	出版年
A. Kato, C.Cortese- Grogan, S. A. Moyer, F. Sugahara, T. Sakaguchi, T. Kubota, N. Otsuki, M. Kohase, M. Tashiro, and Y. Nagai.	Characterization of the amino acid residues of Sendai virus C protein that are critically involved in its interferon antagonism and RNA synthesis down-regulation.	J Virol.	76	7114 - 7124	2004
Y. Nagai, and A. Kato.	Accessory genes of the Paramyxoviridae, a large family of nonsegmented negative strand RNA viruses, as a focus of active investigation by reverse genetics, in press. <i>In</i> Y. Kawaoka (ed.), <i>Biology of Negative Strand RNA Viruses: The Power of Reverse Genetics</i> , Springer-Verlag GmbH and Co. KG	Curr. Topic Microbiol. Immunol	283	198 - 248	2004
中島節子、 海野幸子、 加藤宏幸、 田代真人、 木添和博、 濱野雅子、 三春範夫	風疹のワクチン株と現在流行している野生株の遺伝子構造の比較	病原微生物検出 情報	24	9-10	2003
M.Kuwayama, M.Ito, S.Takao, Y.Shimazu, S.Fukuda, K.Miyazaki, I. Kurane, T.Takasaki.	Detection of Japanese encephalitis virus genome in cerebrospinal fluids from meningitis patients in Japan.	Emerg. Infec. is.	11 (3)	471 - 473	2005

大槻紀之、 田口邦史、 千田恵、 伊藤治。	組織培養用牛血清からの牛ポリオ ーマウイルス遺伝子断片の検出	動物医薬品検 査所年報	40	21 - 23	2003
Mgone, C.S., Mgone, J.M., Takasu, T., Miki, K., Kawanishi, R., Asuo, P.G., Kono, J., Komase, K., Alpers, M.P.	Clinical presentation of subacute sclerosing panencephalitis in Papua New Guinea.	Trop Med Int Health.	8 (3)	219 - 27	2003
Takasu, T., Mgone, J.M., Mgone, C.S., Miki, K., Komase, K., Namae, H., Saito, H., Kokubun, Y., Nishimura, T., Kawanishi, R., Mizutani, T., Markus, T., Kono, J., Asuo, P. G., and Alpers, M. P.	continuing high incidence of subacute sclerosing panencephalitis (SSPE) in the Eastern Highlands of Papua New Guinea.	Epidemiology and Infection.	131	887 - 898	2003
Kumada,A., Komase,K., and Nakayama, T.	Recombinant measles AIK-C strain expressing current wild- type hemagglutinin protein.	Vaccine	22 (3-4)	309 - 316	2004