

会によって値がばらつくことや、population  
が変化しても検出されない可能性がある。従  
って、今後本研究班で詳細に検討して行く必  
要がある。

#### **D. 研究発表**

##### 1. 研究発表

なし

##### 2. 学会発表

なし

#### **E. 知的財産権の出願・登録状況**

##### 3. 特許取得

なし

##### 4. 実用新案登録

なし

##### 5. その他

特記事項なし

## ワクチン製造株の品質管理に関する研究

分担研究者 仁田義弘 武田薬品工業（株）生物製剤部 部長

協力研究者 末原章宏 武田薬品工業（株）生物製剤部 生物技術グループ マネジャー

協力研究者 渡辺秀夫 武田薬品工業（株）生物製剤部 生物第一グループ マネジャー

**研究要旨** 麻しんワクチン、風しんワクチン及びおたふくかぜワクチン製造用ウイルス株の「シードロットシステム」導入のための検討を行った。各ワクチンウイルスにおける出発材料からのマスターシードウイルスの継代歴は、麻しんウイルスで CEF7 代、風しんウイルスで RK5 代、おたふくかぜウイルスで CEF5 代として設定することになる。ウイルスバンキングは、マスターシードウイルスを 1 代継代培養して作製するワーキングシードウイルスを国立感染症研究所など公的機関に登録することが望ましいと思われる。シードウイルス製造及び管理のための文書整備は、現行法を準用した製造条件及び記録様式を採用することで対応を想定しているが、管理方法としての品質規格及び試験法については今後の検討課題となる。

### A. 研究目的

野外試験で安全性と有効性が確認されているウイルス株に由来した麻しんワクチン、風しんワクチン及びおたふくかぜワクチンは、これまで多くの小児に対し接種され感染症予防に寄与している。しかしながら、生ワクチンウイルス自体、本質的に変異しやすい性状を有していることより、野外試験で使用されたウイルス株と同じ品質のワクチンを安定供給するためには、株の継代管理を厳密に行うことが重要となる。

その品質を担保するため、既に欧米で採用され、1986 年に弱毒生水痘ワクチン製造認可に際し採用されている「シードロットシステム」をワクチン製造現場に導入することを目的として、医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業でウイルス株の管理方法の確立及び導入方法について検討さ

れることとなった。

### B. 研究方法

これまで、昭和 50～52 年「シードロットシステムに関する基礎的検討」及び平成 6～8 年「弱毒生ウイルスワクチンの品質管理に関する研究」において、本システム導入のための検討が行われてきた。

本報告書では、「シードロットシステム」導入のための検討として、(1)シードウイルスの設定、(2)シードウイルスバンク登録、(3)シードウイルス継代の条件、(4)シードウイルス製造管理及び文書記録法、(5)シードウイルス品質試験について現状及び考え方などについて報告する。

ワクチンの品質評価のため、今後、動物を用いた実験が必要となる場合は、十分に動物愛護に配慮して行う。

## C. 研究結果

### (1) シードウイルスの設定

現在のシードウイルスの運用法は、麻しん、風しん及びおたふくかぜのいずれも図-1 に示すとおり、製造承認ワクチンを継代培養して製造したワクチン原液の一部を製造用種ウイルスとして保存している。ワクチン原液が消費された段階で、保存した製造用種ウイルスを 1 代継代培養してワクチン原液及び次の製造用種ウイルスの製造を行っており、製造承認ワクチンから継代が 4 代を超えないよう規定されている。

### (2) シードウイルスバンク登録

シードウイルスバンキングについては、第三者の要請により研究などに分与されるものではなく、事故などで使用不能になることを回避するため製造所の他に、国立感染症研究所などの公的機関で分散保管することが望ましいと思われる。

シードウイルスとしては、保有量などの観点からワーキングシードウイルスが対応可能

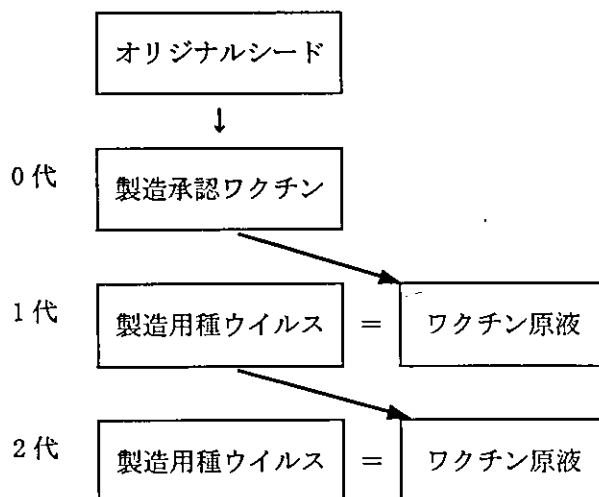


図-1 現在の製造用種ウイルスの運用法

であると思われる。公的機関などへのバンキングに際し、寄託の数量・保管温度・管理条件などの規定が今後の検討課題となる。

### (3) シードウイルス継代の条件

上述したとおり、シードウイルスの継代は、製造承認ワクチン（オリジナルワクチン）から継代が 4 代を超えない範囲内、すなわち、マスターシードは 3 代以内、ワーキングシードは 4 代以内で作製することになる。シードロットシステムを構築するため、生物学的製剤基準では製造承認ワクチンから継代 4 代を超えない範囲でワーキングシードウイルスの再作製が必要となるが、製造に用いるウシ血清の規制(薬食発第 0218004 号)より、各ワクチンの出発材料からのシードウイルス継代歴は以下のとおりとなる。

#### 麻しんウイルス（シュワルツFF-8株）

出発材料を 0 代としたとき、ニワトリ胚細胞(CEF)で 6 代継代培養したものがマスターシードウイルス(CEF7)、これを更に 1 代継代し拡大培養したものをワーキングシードウイルス(CEF8)として設定することになる。

#### 風しんウイルス（T0-336株）

出発材料を 0 代としたとき、ウサギ腎細胞(RK)で 4 代継代培養したものがマスターシードウイルス(RK5)、これを更に 1 代継代し拡大培養したものをワーキングシードウイルス(RK6)として設定することになる。

#### おたふくかぜウイルス（鳥居株）

出発材料を 0 代としたとき、ニワトリ胚細胞(CEF)で 5 代継代培養したものがマスター

シードウイルス(CEF5)、これを更に 1 代継代し拡大培養したものをワーキングシードウイルス(CEF6)として設定することになる。

#### (4) シードウイルス製造管理及び文書記録法

シードウイルスの製造記録については、標準製造法、製造指図記録書など現行のワクチン原液製造時に用いる手順書及び記録様式を準用し対応することを想定している。

また、保管管理の必須事項として保管責任者、保管場所、保管庫、保管温度、保管有効期間、保管管理項目、異常時の措置などを定めた手順書を作成するとともに、使用記録などが明確にできよう出納管理を行うよう規定することを想定している。

#### (5) シードウイルス品質試験

設定を予定しているシードウイルスは、現行の製造法を準用し、生物学的製剤基準で規定されている製造承認ワクチンから継代が 4 代を超えない範囲で作製されることより、生物学的製剤基準の各ワクチンの個別別培養細胞、ウイルス浮遊液及び原液の各工程で規定されている規格及び試験に準拠し、管理することが妥当と考える。

ただし、原液工程で規定されているサル接種試験（麻しんワクチンの弱毒確認試験、風しん及びおたふくかぜワクチンの神経毒力試験）は、連続 5 回のワクチンロットについて確認されているシードウイルス株については、この規定を免除することが可能と思われるが、管理方法としての品質規格及び試験法の設定については今後の検討課題となる。

また、製造承認ワクチンから 8 代継代まで、麻しんウイルスは N、P/V、C、M、F、H 領

域、風しんウイルスは NS、C、E2、E1 領域、おたふくかぜウイルスでは N、P、V/P、M、F、SH、HN 領域の可変領域を含むと考えられる塩基配列に変化のないことが、これまでの研究班での研究成果として確認されている。

品質規格とは別に、シードウイルスの継代によるバリデーションとして、麻しんシードウイルスでは温度感受性試験としてのウイルス増殖性、風しんシードウイルスでモルモット及びウサギを用いたマーカー試験、おたふくかぜシードウイルスではプラークサイズ確認やミックストポピュレーションの混在比の確認が評価項目として考えられる。

#### D. 健康危険情報

なし。

#### E. 研究発表

##### 1. 論文発表

なし。

##### 2. 学会発表

なし。

#### F. 知的財産権の出願・登録状況

（予定を含む。）

##### 1. 特許取得

なし。

##### 2. 実用新案登録

なし。

##### 3. その他

なし。

## シードロットシステム導入のための生ワクチン製造株の品質管理について

分担研究者 李 富雄 北里研究所 生物製剤研究所 部門長  
協力研究者 佐々木 学 北里研究所 生物製剤研究所 部門長  
協力研究者 服部 信章 北里研究所 生物製剤研究所 部門長補佐

**研究要旨：** 弱毒生ウイルスワクチンへのシードロットシステム導入のために、ワクチン株のマスターシード及びワーキングシードの設定を検討した。麻しんワクチン AIK-C 株は、オリジナルワクチン（治験ワクチンに用いた原液）より 1 代継代、風しんワクチン高橋株はオリジナルワクチンより 2 代継代、おたふくかぜワクチン星野株はオリジナルワクチンより 3 代継代した原液の一部をマスターシードとして設定した。また、シードウイルスの品質管理方法について検討を加えたので、その結果について報告する。

### A. 研究目的

弱毒生ウイルスワクチンのシードロットシステム導入にあたって、WHO の生物製剤基準に基づくマスターシード及びワーキングシードの設定、並びに適切な品質管理方法を検討した。

3) おたふくかぜワクチン星野株の治験ワクチン Lot #TV-3 の原液をオリジナルワクチンとし、それより 3 代継代して作製した原液をマスターシード Lot #0-3 と設定した。このマスターシード Lot #0-3 から 1 代継代してワーキングシードを作製する予定である。

### B. 研究結果

#### 1. オリジナルワクチン（製造承認株）を起点としたマスターシード及びワーキングシードの設定について

1) 麻しんワクチン AIK-C 株の治験ワクチン Lot #TV-12 の原液をオリジナルワクチンとし、それより 1 代継代して作製した原液をマスターシード Lot #0-1 と設定した。このマスターシード Lot #0-1 から 1 代継代してワーキングシードを作製する予定である。

2) 風しんワクチン高橋株の治験ワクチン Lot #TV-5 の原液をオリジナルワクチンとし、それより 2 代継代して作製した原液をマスターシード Lot #0-2 と設定した。このマスターシード Lot #0-2 から 1 代継代してワーキングシードを作製する予定である。

#### 2. シードウイルスの継代について

1) ワクチン原液のウイルスは、オリジナルワクチンから継代数が 5 代以内と規定されているので、マスターシードの継代はオリジナルワクチンから 3 代以内、ワーキングシードの継代はオリジナルワクチンから 4 代以内と考えられる。

2) シードウイルスの継代による生物学的性状の変化及び遺伝的变化を少なくするために、シードロットの継代をできるだけ進めないようワーキングシードを大量に作製する。

#### 3. 継代方法の条件案について

今後作製する予定のシードウイルスは、製造承認書或いは製造方法が明記された製造手順書の条件で、以下の点に注意して継代を行う。

1) シードウイルスの感染価を測定し、所定以上の感染価であることを確認して使用する。

2) シードウイルスを一定範囲の m.o.i. で接種する。

3) 培養温度、培養期間を一定の条件で行う。

#### 4. シードウイルスの保管について

1) シードウイルスの保管条件（保管場所、保管庫、保管温度、管理項目など）を設定し、管理する。

2) シードウイルスをリスク分散の目的で、適当な機関に分散保管（バンキング）する。

3) シードウイルスの使用記録及び出納台帳を作成し、管理する。

#### 5. ワクチン株の品質管理について

1) シードロットの品質試験項目は生物学的製剤基準の原液の試験（サル接種試験は製剤の連続した 5 回の製品において弱毒が確認された場合には、本試験を除く）を適用することが適当ではないかと考えられる。

2) 麻しんワクチン AIK-C 株の継代におけるシードウイルスの性状（温度感受性、ブラックサイズ、塩基配列）の安定性は、温度感受性及びブラックサイズはオリジナルワクチンから 5 代まで安定であった。更に継代を進めると、温度感受性は 7 代目および 10 代目では非温度感受性ウイルスの増殖が確認され、変化した。ブラックサイズは 10 代まで有意な変化が認められなかった。オリジナル

ワクチンから 2 代目と 10 代目のウイルスについて、N、P、M、F、H、L の可変領域の塩基配列には変化がなかった。これらの結果から、AIK-C 株の継代における品質管理は、温度感受性試験が適当と考えられる。

3) 風しんワクチン高橋株の継代におけるシードウイルスの性状（温度感受性、塩基配列）の安定性は、RK13 細胞でのウイルス増殖の温度感受性はオリジナルワクチンから 10 代まで安定であった。また、2 代目と 10 代目のウイルスについて、E1 と NS4 領域の塩基配列には変化がなかった。風しんワクチンは、モルモット及びウサギに対する免疫原性の低下を弱毒化のマーカーとして適用しているため、高橋株の継代における品質管理は、このマーカー試験か或いは *in vitro* の温度感受性試験が適当と考えられる。

4) おたふくかぜワクチン星野株の継代におけるシードウイルスの性状（ブラックサイズ、塩基配列）の安定性は、オリジナルワクチンから 3 代目のウイルスは Small size のブラック、11 代目は Median size のブラックの混在が観察された。また、オリジナルワクチンから 3 代目と 11 代目のウイルスについて、F-SH-HN 領域の塩基配列には変化がなかった。星野株の継代における品質管理は、ブラックサイズ試験が適当であるか検討が必要である。

## C. 研究発表

1. 論文発表  
なし。
2. 学会発表

李富雄、中島伸二、中山哲夫、佐々木繁子：弱毒生風疹ワクチンウイルス高橋株の安定性に関する研究 第3回日本ワクチン学会、1999年

なし。

2. 実用新案登録

なし。

3. その他

なし

**F. 知的財産権の出願・登録状況**

（予定を含む。）

1. 特許取得

## ワクチン製造株の品質管理に関する研究

分担研究者 大隈 邦夫（財）化学及血清療法研究所 第一製造部 部長  
協力研究者 倉永 雅彦（財）化学及血清療法研究所 第一製造部第二課 課長  
協力研究者 上田 謙二（財）化学及血清療法研究所 第一製造部 上級技術員

**研究要旨** 弊所の弱毒生ウイルスワクチン（風しん、おたふくかぜ）について、シードロットシステム導入についての課題を検証し、マスターシード及びワーキングシードの定義などの対応へ着手した。今後も各課題への対応を継続して実施する。

### A. 研究目的

弱毒生ウイルスワクチンの品質保証においては、シードロットシステムが重要であることは公知である。弊所の生産する弱毒生ウイルスワクチンでは、乾燥弱毒生風しんワクチン（松葉株）、乾燥弱毒生おたふくかぜワクチン（宮原株）及び乾燥細胞培養痘そうワクチン（LC16m8 株）が対象である。本研究では風しん及びおたふくかぜについて、シードロットシステム導入の為の課題を検証し、その対応に着手した。

### B. 研究方法

弊所の松葉株は 1969 年の開発であり、宮原株は 1970 年の開発である。開発当時の成績及び資料から、現在までの当該生ワクチン生産・出荷の実績を確認した。

更に、研究班会議（2004 年 1 月 11 日）での加藤篤主任研究者からの提案を踏まえて、以下の 4 項目についての検証に着手した。

- 1) マスターシード及びワーキングシードの定義・指定、
- 2) 製造株のバンキング、
- 3) ウイルス継代条件、
- 4) 安定性の評価（品質試験）

### C. 研究結果

#### 1) マスターシード及びワーキングシードの定義・指定

開発当時の成績及び資料から、現在までの当該生ワクチン生産・出荷の実績を踏まえ、更に、研究班会議での提案を踏まえて、オリジナルワクチン、オリジナルシードウイルス、マスターシード及びワーキングシードについて指定した。製造承認事項などの機密事項にも関することから、概要についてのみ下記に示した。

#### 風しん（松葉株）

オリジナルワクチン（治験に用いたワクチン）の継代歴は RK12 代である。従って、班会議での提案（WHO 基準など）に照らして、RK12 代がオリジナルワクチンとなる。

オリジナルシードウイルスは RK11 代、マスターシード（1 次シードロット）は RK12 代とし、ワーキングシード（2 次シードロット、製造用シード）は RK13 代、ワクチン原液は RK14 代となる。

この結果は弊所がこれまで出荷した製剤の継代数の範囲に相当し、使用実績の面でも問題はないと考える。

#### おたふくかぜ（宮原株）

オリジナルワクチン（治験に用いたワクチン）の継代歴は CE27 代である。従って、班会議での提案（WHO 基準など）に照らして、CE27 代がオリジナルワクチンとなる。

オリジナルシードウイルスは CE26 代、マスターシード（1 次シードロット）は CE27 代とし、ワーキングシード（2 次シードロット、製造用シード）は CE28 代、ワクチン原液は CE29 代となる。

この結果は弊所がこれまで出荷した製剤の継代数から 1 代追加となるが、従前の定義で継代した場合でも 4 代となり、基準である 5 代以内も満たしている。

#### 2) 製造株のバンキング

ワクチン製造株という特殊性から、事故などの対応のため、リスク分散の観点からもバンキングの必要性には賛同する。今後は、保管する体制やルール（保管する機関、必要な量及び種類など）の整備が必要と考える。

#### 3) ウイルス継代条件

製造承認事項に基づき、従来から生産方法と同一の条



件にて、継代を実施してきている。今後、moi、培養温度や期間などの明記などの整備が必要と考える。

#### 4) 安定性の評価（品質試験）

適切な継代数での、生物学的製剤の規定に従った品質管理試験を実施する。更に、温度感受性、プラークサイズあるいは塩基レベルでの評価を考える。

#### D. 考察

開発当時の成績及び資料から、現在までの当該生ワクチン生産・出荷の実績を確認し、研究班会議での加藤篤主任研究者からの提案を踏まえて、以下の4項目についての検証に着手した。

- 1) マスターシード及びワーキングシードの定義・指定、
- 2) 製造株のバンキング、
- 3) ウイルス継代条件、
- 4) 安定性の評価（品質試験）

今後は、上記1)にて定義したマスターシードから、2)以降の項目の確認を継続していく。

#### E. 結論

特に無し。

#### F. 健康危険情報

特に無し。

#### G. 研究発表

特に無し。

#### H. 知的財産の出願・登録状況

特に無し。

## ワクチンの製造株の品質管理に関する研究

分担研究者：岡部信彦 国立感染症研究所 感染症情報センター

研究協力者：多屋馨子 国立感染症研究所 感染症情報センター

### 研究要旨

現行の予防接種後副反応報告ならびに予防接種後健康状況調査より、報告された副反応を解析し、予防接種後副反応報告に関しては、必要な検索が容易に実施できるようなデータベースファイルを作成した。予防接種後健康状況調査については、平成 8-14 年分を累積してワクチン別に健康状況の変化を集計した。予防接種副反応報告については、今回作成したデータベースファイルを用いることにより、ワクチン別、ロット別に副反応報告を迅速に集計、解析可能となり、新たなレイアウトを作成することにより、解析目的に応じた検索システムの作成が容易となった。今後シードロットシステムが導入された後は、現行の予防接種後副反応報告あるいは、別の報告システムを構築して副反応を収集し、このファイルに入力することにより、これまでのワクチンとの比較ならびに新しいワクチンの副反応解析が容易になると考えられた。

### A. 研究目的

平成6年の予防接種法改正により、平成8年4月から予防接種後健康状況調査が、平成8年10月から予防接種後副反応報告が全国規模で実施されている。これらは定期予防接種後に起こった健康状況の変化、副反応を全国的に調査するもので、任意接種のワクチンは含まれていない。

任意接種で入院を要するような重篤な副反応が起こった場合は、薬事法に基づき「医薬品安全性情報報告書」が厚生労働省に提出される。医薬品を適正に使用したにもかかわらず一定の健康被害が生じた場合、生物由来製品を適正に使用したにもかかわらず、その製品が原因で感染症にかかり、健康被害が生じた場合は、医薬品医療機器総合機構に申請を行い、定期接種と同じく、認定審査会を経て、その健康被害に対して救済が行われるかどうか決定される。

シードロットシステムの開発に伴い、開発後市販されたワクチンの品質管理を実施するためには、接種後副反応調査につき検討する必要がある。そのためには、現行の副反応報告について検討し、今後解析をより簡易に実施できるシステムを作成しておくことが求められる。本研究では現行の副反応報告をまとめ新しいシステム導入後には、製造株の品質管理を副反応によって調査することを目的とする。

### B. 研究方法

現在、定期接種に導入されているワクチンの副反応については、予防接種後副反応調査ならびに予防接種後健康状況調査により調査されている。シードロットシステム開発後のワクチンの副反応について調査検討するためには、現行のワクチンについて解析し、比較検討するシステムを作成しておく必要がある。そのため、現在報告されている予防接種後副反応報告書からデータベースファイルを作成し、副反応をワクチン別、ロット別、年齢別、等のカテゴリーにより簡易に検索解析できるシステムを作成する。データベースファイル作成には汎用ソフト(File Maker Pro)を使用した。また、予防接種後健康状況調査により報告された健康の変化について平成 8 年から 14 年度分の報告書からワクチン別に集計し、現行のワクチン接種後の健康状況をまとめた。

### C. 研究結果

平成8年から14年までの予防接種後健康状況調査の結果を公開されている報告書から表 1 にまとめた。

別紙 予防接種後副反応報告書から図 1 に示したように、データベースファイルを作成した。データはサンプルデータを日本脳炎ワクチン後と仮定して 5 人分作成し、例として表示した。本ファイルを用いることにより、一覧表示 (図 2)、ワクチン別報告 (図 3)、ロット別報告

(図4)、が可能となり、新規レイアウトを作成することにより検索したい項目につき一覧表として表示可能になった。

#### D. 考察

副反応報告の収集は定期接種対象疾患である場合、現行の予防接種法に基づいた副反応報告が利用可能である。現行ワクチンのデータベースを作成しておくことにより、新規導入された製造株使用後のワクチン副反応と比較検討することが容易となる。稀な副反応を感知するためには、全国的に周知されている報告システムを利用することが必要であり、解析に用いる必要がある検索システムを作成しておくことにより、迅速に対応が可能になるものとする。

#### E 結論

現行の副反応報告書を基に、副反応データベースファイルを作成した。シードロットシステム導入までに、現行の副反応をデータベース化しておけば、新規導入された製造株の副反応と現行のワクチンとを比較検討することが可能となった。

#### F 健康危険情報

特になし

#### G 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Hashimoto S, Kawado M, Seko R, Kato M, Okabe N. Bias of vaccination coverage in a household

questionnaire survey in Japan. J Epidemiol. 2005;15(1):15-9.

- 2) 田中政宏, 岡部信彦. 国外における予防接種の最近の動向 WHO の予防接種拡大計画と米国の予防接種プログラム. 小児科診療. 67 巻 11 号 Page1819-1827.2004.
- 3) 岡部信彦. 知っておきたい知識 予防接種法(予防接種制度). 小児看護 27 巻 12 号 Page1569-1573.2004.
- 4) 岡部信彦, 新井智. 日本脳炎ワクチン. 臨床と微生物. 31 巻 4 号 Page343-347.2004.
- 5) 多屋馨子. 定期接種 副反応. 小児看護 27 巻 12 号 Page1609-1615.2004.
- 6) 多屋馨子. わが国の麻疹・風疹の現状と対策 この秋にぜひ風疹ワクチンを. 臨床と微生物. 31 巻 5 号 Page446-447.2004.
- 7) 多屋馨子. 医療関係者に対する予防接種. 総合臨床. 53 巻 6 号 Page1886-1890.2004.

##### 2. 学会発表

- 1) 岡部信彦. ウイルス感染症の最前線 新たなる感染症の発生への対応. 日本アレルギー学会. 2004
- 2) 多屋馨子. ワクチンに関する最近の話題 予防接種の最新情報と vaccine preventable disease の国内発生状況. 日本臨床ウイルス学会. 2004.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

現時点ではなし

別紙1

予防接種後副反応報告書

市町村長 殿

患者 (被接種者)	氏名		性別	1 男 2 女	年齢	歳	ヵ月	(昭和・平成 年 月 日生)	
	住所					電話番号			
	保護者氏名								
接種者	氏名(名称)								
	住所					電話番号			
	接種場所	1 診療所 2 病院 3 保健所 4 学校 5 公民館 6 その他( )							
報告者	氏名(名称)								
		1 接種者 2 主治医 3 本人又は保護者 4 その他( )							
	住所								
接種の状況	接種日	平成 年 月 日				午前・午後	時	分	
	ワクチンの種類	製造所名				ロット番号			
		接種部位				接種方法			
	接種前の体温	℃							
	家族歴					出生体重	グラム		
	予診票での留意点 (アレルギー・基礎疾患・発育・最近1ヵ月以内のワクチン接種や病気等)								1 なし 2 ある
副反応の概要	発生時刻	平成 年 月 日				午前・午後	時	分	
	概要(症状・徴候・臨床経過・診断・検査)								
	他の疾患の可能性								
※ 予後	1 死亡 剖検所見( )								
	2 重篤(死亡の危険あり)								
	3 入院(病院名)					入院日	退院日		
	4 後遺症								
	5 その他( )								
※回復状況	1 回復している 2 まだ回復していない 3 不明								
報告回数	1 第1報 2 第2報 3 第3報以後								

市町村記入欄

受付日時	年 月 日 時 分	受付者氏名	
------	-----------	-------	--

この報告書は、予防接種の接種後、別添報告基準に該当する者を診断したときに、必要事項を記載の上、直ちにその者の居住地を管轄する市町村長に提出すること。ただし、※欄については、経過観察後の報告(第2報)でも差し支えないこと

<記載上の注意>

- 1 用紙の大きさはA列4番にすること。
- 2 アラビア数字のある場合は、該当する数字を○で囲むこと。
- 3 報告内容は、別添の報告基準を参照のこと。

表1 予防接種後健康状況調査[平成8年（インフルは平成13年）～14年累計]報告書より改変<sup>1)</sup>：空欄は調査が実施されていない項目

	37.5-38.4℃	38.5℃以上	局所反応 (BCG： 湿潤)	けいれん	嘔吐	下痢	せき 鼻水	蕁麻疹	発疹	リンパ 節腫脹	関節 痛	全身 倦怠 感	頭痛
DPT 1期1	5.6%	8.4%	13.8%	0.0%	3.3%	5.3%	14.6%						
DPT 1期2	5.4%	8.0%	29.6%	0.1%	3.3%	7.4%	19.3%						
DPT 1期3	5.3%	8.7%	22.3%	0.2%	3.3%	7.3%	18.8%						
DPT 1期追	6.0%	7.7%	41.3%	0.1%	3.5%	6.3%	21.0%						
BCG 0-3歳	0.0%	0.0%	0.9-1.9%	0.0%						0.4-0.8%			
BCG 小	0%	0%	2.9-3.1%	0.0%						0.4-0.6%			
BCG 中	0%	0%	1.1-1.5%	0%						0.8%			
ポリオ 1	5.5%	6.8%		0.1%	4.4%	13.0%							
ポリオ 2	5.4%	9.8%		0.2%	4.9%	12.9%							
麻疹	8.9%	13.6%	4.4%	0.4%				2.9%	8.8%				
風疹	4.4%	6.8%	2.5%	0.1%				1.4%	3.0%	1.0%	0.5%		
日脳 1期1	3.5%	5.5%	9.6%	0.0%				1.3%	1.2%				
日脳 1期2	3.3%	5.7%	11.4%	0.1%				0.9%	1.1%				
日脳 1期追	3.2%	4.9%	11.0%	0.1%				0.8%	1.0%				
日脳 2期	1.9%	1.4%	13.7%	0%				0.9%	0.4%				
日脳 3期	0.9%	0.4%	11.7%	0%				0.7%	0.6%				
DT	1.6%	1.0%	28.0%	0.0%	0.8%	1.7%	5.2%						
インフル	0.9%	0.1%	7.3%		0.2%			0.2%				2.1%	1.5%

BCG小：小1-2のBCG、BCG中：中1-2のBCG、日脳、日本脳炎、インフル：インフルエンザ

\*DPT、麻疹、風疹、日脳、DT、インフルは接種後28日以内、ポリオは35日以内、BCGは4か月以内の健康状況調査である。

図1 データベースファイル概要

加藤功報告書2004用.fp5

個人票	番号	性	歳	月	日	年齢不明時〈生年月日不明時〉	都道府県
接種日	ワクチン	製造メーカー	ロット				
副反応発生日	日	時	分	秒	回復状況		
副反応報告の概要							
その他特記事項							
入院日	入院日数						
退院日							
コメント							
報告者の種類							
受付日							

図2 一覧表表示

加藤功報告書2004用

一覧表	番号	ワクチン	期	ロット	歳	性	接種日	日	時	分	秒	副反応報告の概要	予後	コメント	都道府県
	1	日製	加藤 a	3	男	2002.5.5	7	発赤、腫脹					回復	ワクチンアレルギー疑い	東京都
	2	日製	加藤 b	3	男	2002.5.15	9	発赤					回復	ワクチンアレルギー疑い	大阪府
	3	日製	加藤 c	3	女	2002.7.9	8	発熱(39.5℃)					未記入	その他の経過不明	愛知県
	4	日製	加藤 d	3	女	2002.6.25	3	発熱発疹					入院、回復	ワクチンとの関連不明	福岡県
	5	日製	加藤 e	3	女	2002.7.11	8	顔色不良、気分不良、口唇色不良、眩暈					回復	vasovagal syncope? アナフィラキシー?	北海道

レコード数: 639  
該当件数: 5  
未ソート

図3 ワクチン別報告

加藤明報告書2004用

ワクチン...

ワクチン別報告書

日誌	報告者の性別	年齢	性別	接種年月日	副反応内容1	副反応内容2	他疾患の可能性	他疾患の可能性内容	予後	回復状況
1	接種者	9	男	0	10a 基準外報告 (同所反応発未観察等)		なし		回復	回復
2	その他	9	男	9	7 全身の発疹		未記入		回復	未記入
3	主治医	9	女	0	8 39℃以上の発熱		あり	急性咽喉炎	未記入	未回復
4	主治医	9	女	9	9 けいれん		あり	他の中枢性疾患の可能性	入院、回復	回復
5	接種者、主治医	4	女	0	9 その他の異常反応	顔色不良、気分不良、徐脈	未記入		転院	回復

スクリーンショットの左側には「ページ数: 1」および「スクリーンショット」のラベルがあり、下部には「実行」および「キャンセル」のボタンが配置されている。

図4 ロット別報告

加藤明報告書2004用

ロット別報告書

日誌	番号	性別	年齢	接種年	接種月	接種日	副反応報告の概要	予後	回復状況
a	1	男	9	2004	6	0	発赤、膨疹	回復	回復
b	2	男	9	2004	6	9	発疹	回復	未記入
c	3	女	9	2004	7	0	発熱(39.6℃)	未記入	未回復
d	4	女	9	2004	6	9	急性発疹	入院、回復	回復
e	5	女	4	2004	7	0	顔色不良、気分不良、口唇色不良、徐脈	転院	回復

スクリーンショットの左側には「ページ数: 1」および「スクリーンショット」のラベルがあり、下部には「実行」および「キャンセル」のボタンが配置されている。

### III. 研究成果の刊行に関する一覧表

#### <邦文>

1. Kato, A., 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).
2. Nagai, Y., 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. *In* Y. Kawaoka (ed.), *Biology of Negative Strand RNA Viruses: The Power of Reverse Genetics*, Springer-Verlag GmbH and Co. KG, *Curr. Topic Microbiol. Immunol* **283**:198-248 (2004)
3. Hashimoto S, Kawado M, Seko R, Kato M, Okabe N. Bias of vaccination coverage in a household questionnaire survey in Japan. *J Epidemiol.* **15**(1):15-19. (2005)

#### <和文>

1. 加藤 篤 自然免疫に対抗するセンダイウイルス蛋白質 ウイルス **54**:179-188 (2004)
2. 加藤 篤 ウイルス感染とインターフェロンシステムからの回避 臨床免疫 **41**:611-616 (2004)
3. 田中政宏, 岡部信彦. 国外における予防接種の最近の動向 WHO の予防接種拡大計画と米国の予防接種プログラム. *小児科診療.* **67** 卷 11 号 Page1819-1827.(2004).
4. 岡部信彦. 知っておきたい知識 予防接種法(予防接種制度). *小児看護* **27** 卷 12 号 Page1569-1573.(2004).
5. 岡部信彦, 新井智. 日本脳炎ワクチン. *臨床と微生物.* **31** 卷 4 号 Page343-347.2004.
6. 多屋馨子. 定期接種 副反応. *小児看護.* **27** 卷 12 号 Page1609-1615.(2004).
7. 多屋馨子. わが国の麻疹・風疹の現状と対策 この秋にぜひ風疹ワクチンを. *臨床と微生物.* **31** 卷 5 号 Page446-447.(2004.)
8. 多屋馨子. 医療関係者に対する予防接種. *総合臨床.* **53** 卷 6 号 Page1886-1890.(2004).



## Characterization of the Amino Acid Residues of Sendai Virus C Protein That Are Critically Involved in Its Interferon Antagonism and RNA Synthesis Down-Regulation

Atsushi Kato,<sup>1\*</sup> Case Cortese-Grogan,<sup>2</sup> Sue A. Moyer,<sup>2</sup> Fumihiko Sugahara,<sup>3</sup>  
Takemasa Sakaguchi,<sup>3</sup> Toru Kubota,<sup>1</sup> Noriyuki Otsuki,<sup>1</sup> Masayoshi Kohase,<sup>1</sup>  
Masato Tashiro,<sup>1</sup> and Yoshiyuki Nagai<sup>4</sup>

Department of Virology 3, National Institute of Infectious Diseases, Musashi-Murayama, Tokyo 208-0011,<sup>1</sup> Department of Virology, Graduate School of Biomedical Sciences, Hiroshima University, Minami-ku, Hiroshima 734-8551,<sup>3</sup> and Toyama Institute of Health, Kosugi-machi, Toyama 939-0363,<sup>4</sup> Japan, and Department of Molecular Genetics and Microbiology, University of Florida, College of Medicine, Gainesville, Florida 32610<sup>2</sup>

Received 12 January 2004/Accepted 25 February 2004

Sendai virus (SeV) encodes two accessory proteins, V and C, in the alternative reading frames in the P gene that are accessed transcriptionally (V) or translationally (C). The C protein is expressed as a nested set of four C-coterminal proteins, C', C, Y1, and Y2, that use different initiation codons. Using HeLa cell lines constitutively expressing the various C proteins, we previously found that the smallest (the 175-residue Y2) of the four C proteins was fully capable of counteracting the antiviral action of interferons (IFNs) and inhibiting viral RNA synthesis and that the C-terminal half of 106 residues was sufficient for both of these inhibitory functions (A. Kato et al., *J. Virol.* 75:3802–3810, 2001, and A. Kato et al., *J. Virol.* 76:7114–7124, 2002). Here, we further generated HeLa cell lines expressing the mutated C (Cm) proteins with charged amino acids substituted for alanine residues at either positions 77 and 80; 114 and 115; 139 and 142; 151, 153, and 154; 156; or 173, 175, and 176. We found that only the mutations at positions 151, 153, and 154 abolished IFN antagonism. All the Cm proteins lost the ability to bind with STAT1 under our assay conditions, regardless of their ability to inhibit IFN signaling. On the other hand, the Cm proteins that altered the tyrosine phosphorylation and dephosphorylation of STAT1 and STAT2 always retained IFN antagonism. Thus, the abnormality of phosphorylation or dephosphorylation appeared to be a cause of the IFN antagonism by SeV C. Regarding viral RNA synthesis inhibition, all mutants but the mutant with replacements at positions 114 and 115 greatly reduced the inhibitory activity, indicating that anti-RNA synthesis by the C protein is governed by amino acids scattered across its C-terminal half. Thus, amino acid sequence requirements differ greatly between IFN antagonism and RNA synthesis inhibition. In addition, we confirmed that another SeV accessory protein, V, does not antagonize IFN.

Sendai virus (SeV) is an enveloped virus with a linear, non-segmented, negative-sense RNA genome of 15,384 nucleotides and belongs to the genus *Respirovirus* of the subfamily *Paramyxovirinae*. SeV contains six genes in the order 3'-(leader)-*N-P-M-F-HN-L*-(trailer)-5' on the genome. The monocistronic mRNAs are transcribed by the viral RNA polymerase composed of L and P proteins (16). However, the P gene is exceptional in that it gives rise to multiple protein species by a process known as RNA editing and by the use of an overlapping open reading frame (ORF). The P protein is translated from the unedited mRNA, which is the exact copy of the P gene, while the V protein is translated from the edited mRNA, in which one nontemplated G residue is cotranscriptionally inserted to the editing position. The P and V proteins, therefore, have a common N terminus but have different C termini because the reading frame for V changes by +1 relative to the P frame (for a review, see references 33 and 38). The V protein

is encoded by almost all viruses that are members of the subfamily *Paramyxovirinae*. The unique C-terminal region of V contains seven cysteine residues highly conserved among paramyxoviruses, forms zinc finger-like motifs, and, indeed, binds Zn<sup>2+</sup> (7, 20, 35, 44, 51).

The C protein is translated from the -1 reading frame relative to the frame common to P and V. The SeV P and V proteins are initiated at the AUG codon at position 104, whereas the SeV C reading frame produces a nested set of C', C, Y1, and Y2 proteins initiating, respectively, at a non-AUG (ACG) codon at position 81 and at AUG codons at positions 114, 183, and 201 (4, 15, 45). The C', C, Y1, and Y2 proteins are terminated at the same position 726 and are collectively called C proteins. Among them, the C protein is the major species expressed in infected cells, at a molar ratio severalfold higher than that of the other three proteins (32). The C proteins are expressed by the viruses belonging to three genera, *Respirovirus*, *Morbillivirus*, and *Henipavirus*, and by Tupaia paramyxovirus-like viruses, but they are not expressed by the viruses belonging to two genera, *Rubulavirus* and *Avulavirus* of *Paramyxovirinae* (reviewed in reference 37). The amino acid sequence of the C proteins is well conserved within each genus

\* Corresponding author. Mailing address: Department of Virology 3, National Institute of Infectious Diseases, Gakuen 4-7-1, Musashi-Murayama, Tokyo 208-0011, Japan. Phone: 81 42 561 0711, ext. 530. Fax: 81 42 567 5631. E-mail: akato@nih.go.jp.

but poorly conserved (less than 20%) between different genera. The C proteins are all relatively small (150 to 220 amino acids [aa]) and highly basic, with an isoelectric point of around 10 (38).

Both the V and C proteins of SeV are categorized as accessory proteins that may not always be essential for the viral life cycle, because there is at least one virus which does not have or does not express these proteins in its close relatives (the genus *Respirovirus*) (33). We have employed two complementary approaches, SeV reverse genetics to delete the V and C proteins and plasmid-based expression of these proteins, to address how these proteins contribute to actual viral replication and pathogenesis (reviewed in references 37, 38, and 39). The C proteins are indeed dispensable for SeV replication in cultured cells, but the lack of C proteins profoundly affects the viral life cycle. Compared with the wild type, mutant SeV with the four C proteins (C'/C/Y1/Y2) knocked out produced nearly  $1/10^4$  of the progeny virus in ovo,  $1/10^3$  in tissue cultured cells, and an undetectable level in mouse lungs (32). The SeV C protein is extremely versatile. The first finding about the role of SeV C proteins involves the inhibition of viral RNA synthesis; C proteins supplied from the plasmid inhibit minigenome RNA synthesis in a dose-dependent manner in vitro (3). A larger quantity of viral RNA is synthesized in cells infected with the four-C knockout SeV than in the parental wild-type SeV-infected cells at the late stage of infection (17). Moreover, all the C-, Y1-, or Y2-expressing cell lines suppress SeV multiplication at the transcriptional level (24). Analysis of the stable transformants constitutively expressing various C-truncates from the N and C termini indicated that the 106-residue C-terminal half of the C proteins is sufficient for viral RNA inhibition (23). In the cells constitutively expressing SeV C protein, SeV growth is significantly suppressed because of the inhibition of viral RNA synthesis. This growth inhibition by SeV C proteins is also found in closely related human parainfluenza virus type I (hPIV1) but not in the more distantly related hPIV3 and measles virus. Based on these findings, C proteins are thought to down-regulate viral RNA synthesis specifically. This inhibition is suggested to occur via binding of the C proteins with the L protein (14, 19).

The second finding about the role of SeV C proteins concerns the promotion of viral assembly and/or budding. SeV C proteins are expressed abundantly in infected cells but are incorporated in trace amounts in the virions and, thus, are practically considered to be nonstructural proteins having nothing to do with virion assembly (34, 46). However, as described above, production of the progeny viruses was hampered greatly in the cells infected with the four-C knockout SeV even though viral genomic RNA and proteins were accumulated in the cells. More surprisingly, in the culture supernatant of cells infected with the SeV mutant with the four C proteins knocked out, there were many noninfectious particles with a sedimentation profile distributing widely from light to heavy fractions in the sucrose gradient centrifugation and with a highly anomalous morphology in the electron microscope observation (17). The role of the C proteins in this process remains to be clarified.

The third finding about the role of SeV C proteins is that they counteract the antiviral activity of interferons (IFNs). Studies performed in the 1960s showed that preinfection or

persistent infection of cells with SeV or hPIV3 enhanced the growth of heterologous postinfecting IFN-sensitive viruses, such as Newcastle disease virus and vesicular stomatitis virus (VSV), suggesting that preinfection with SeV and hPIV3 somehow rendered cells unresponsive to autocrine IFNs (18, 36). The anti-IFN capacity of these viruses was recently established (5, 13). HeLa cells preinfected with the parental wild-type and C'/C-, C'/C/Y1-, and V-knockout SeVs circumvented the anti-VSV action of IFN- $\beta$ , whereas the virus with the four C proteins knocked out lost this IFN antagonism (13). The C-, Y1-, or Y2-expressing cell lines were all capable of circumventing the activation of IFN-stimulated genes (ISGs) and the induction of an antiviral state by IFN- $\alpha$  or - $\beta$  and IFN- $\gamma$  (24). These observations suggested that IFN signaling was somehow blocked by the SeV C', C, Y1, or Y2 protein without the aid of other viral proteins. An analysis of the stable transformants expressing various truncates from the N and C termini indicated that the 106-residue C-terminal half of C protein was sufficient for IFN antagonism (23). The C protein with a spontaneous mutation at residue 170 of phenylalanine to serine (C<sup>F170S</sup>) (22), within the 106-residue region, neither antagonized IFNs (10) nor, compared to the effect of the parental C in vitro, inhibited viral RNA synthesis (14). IFN antagonism is fully generated even in cells expressing trace amounts of the C proteins, in which the inhibition of viral RNA synthesis is no longer observed.

The fourth finding about the role of the SeV C proteins is that they suppress apoptosis. The parental wild-type SeV grows without any significant cytopathic effect in Hep-2 cells, and infected cells tolerate the apoptotic stimulus caused by VSV (29). Though cells infected either with C'-, C'/C'-, or C'/C/Y1-knockout viruses tolerate the apoptosis signals as do the wild-type SeV-infected cells, cells infected with the four-C knockout SeV clearly showed the condensation of nuclei and the fragmentation of chromosomal DNA, indicating that SeV C proteins had antiapoptotic activity (28).

In this report, we attempted to determine which regions of the SeV C protein were responsible for IFN antagonism and for the down-regulation of viral RNA synthesis by using cells expressing the wild-type C protein and several mutant C (Cm) proteins with charged amino acid substitutions for alanine residues, most of which were within the C-terminal half. A substitution at positions 151, 153, and 154 of the C protein abolished the anti-IFN and RNA synthesis-inhibiting activities simultaneously, but all of the other substitutions except the mutation at positions 114 and 115 abolished only the RNA synthesis-inhibiting activity. From these results, we conclude that the amino acids scattered throughout the C-terminal half of the C protein govern the down-regulation of viral RNA synthesis, while more limited residues are critical for playing a role in IFN antagonism. Using the various Cm proteins, we further found that SeV C proteins participate in the inhibition of IFN signaling through the unusual phosphorylation and dephosphorylation of STAT1 and STAT2, which play key roles in an IFN- $\alpha/\beta$  system.

#### MATERIALS AND METHODS

**Plasmids and stable transformants.** A plasmid, pKS-C, expressing C protein but not Y1 or Y2, was described previously (24). The plasmids encoding the mutated C proteins pTM1gstC'2, pTM1gstC'3, pTM1gstC'4, pTM1gstC'5,

pTM1gstC'6, and pTM1gstC'8 (14), all with charged amino acids substituted for alanine residues, were used as the PCR templates to obtain a DNA fragment with the suitable restriction enzyme sites in both termini. Briefly, two primers, CF (5'-GAATTC<sup>HindIII</sup>AAGCTTGGCC<sup>114</sup>ATGCGCTTCATTCTTAAAG-3') and CR (5'-GAATTC<sup>BamHI</sup>GGATCCCTA<sup>726</sup>TACTCTTGCACATGTG-3') were used for the amplification. In the primer sequences, the initiation and termination codons are underlined and the positions from the cap site of P/V mRNA are numbered (see below for restriction sites). A three nucleotide-region (italicized) upstream of the initiation codon was modified to optimize for the translation according to Kozak's rule (30).

DNA fragments corresponding to V, V/P common, and V unique regions were prepared by PCR using a template, pSeV<sup>+</sup>-4C<sup>-</sup>, which has disrupted ORFs of all of the four C proteins without changing an overlapping P ORF (32). Two primers, VF (5'-TGAG<sup>HindIII</sup>AAGCTTGGTACC<sup>104</sup>ATGGATCAAGATGC-3') and V/PR (5'-ATCGAT<sup>BamHI</sup>GGATCCCTAGCCCTTTTGGTGA-3'), were used for the amplification of the 5' terminal half of the V ORF encoding the V/P common domain. For the V ORF, fragments of the 5' half and 3' half were individually amplified by using primers to insert a G residue at the editing site of the genomic cDNA ORF. The primers VF and Vedit (5'-GACTCAACAAAAAGGGGCATAGGAGAGAA-3') were used for the 5' half of the fragment, and VeditC, a complementary primer of Vedit, and VR (5'-ATCGAT<sup>BamHI</sup>GGATCCCTACGAGCGGAAGATTTC-3') were used for the 3' half of the fragment. The two fragments were purified and mixed and were further combined at the overlapping site by PCR using both termini of primers VF and VR. For the V unique domain, fragments were amplified by PCR with primers MycF (5'-TGAG<sup>HindIII</sup>AAGCTTGGTACCATGGAGCAGAAGC-3') and VR. In the primer sequences, the initiation and termination codons are also underlined (see below for restriction sites).

These fragments were cut with HindIII and BamHI (shown as superscripts in the primers) and cloned into the same sites of the pKS336 plasmid (GenBank accession number AF403737). The plasmids encoding C proteins with the charged amino acids substituted for alanine residues at the indicated positions were as follows: 77 and 80 (pKS-Cm2); 114 and 115 (pKS-Cm3); 139 and 142 (pKS-Cm4); 151, 153 and 154 (pKS-Cm5); 156 (pKS-Cm6); and 173, 175, and 176 (pKS-Cm8). Each position was numbered from the first amino acid of the C protein. The plasmids encoding the V, V/P common, and V unique regions were named pKS-V, pKS-V/P, and pKS-Vu, respectively. Furthermore, the plasmid encoding the mutant V protein with the two substitutions in the cysteine residues (C362S and C365R) was named pKS-Vcys. This mutation reduced zinc-binding capacity to 30% and impaired virus virulence to mice to 1/25 (7, 20). After the verification of the sequences, stable transformants expressing the designed proteins were established as described previously (24).

**Immunoprecipitation.** Parental HeLa cells and the wild-type or mutated C- or V-expressing HeLa cells were inoculated to a density of  $5 \times 10^5$  cells per plate in the 35-mm plates 1 day before the labeling. The next day, cells were washed once with phosphate-buffered saline (PBS) and replaced in 0.5 ml of Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) without methionine. After 30 min for the starvation, 0.74 MBq (20  $\mu$ Ci) of L-[<sup>35</sup>S]methionine (43.48 TBq/mmol; ICN Inc., Aurora, Ohio) per plate was added. Cells were incubated at 37°C for 2 h in 5% CO<sub>2</sub> and then washed twice with ice-cold PBS. The harvested cells were then lysed with 0.5 ml of radioimmunoprecipitation assay buffer on ice for 5 min and spun at 14,000  $\times$  g for 5 min at 4°C. Immunoprecipitations were performed as described previously (26), and the precipitates were analyzed on a 4 to 12% acrylamide-Bis-Tris gradient gel (NuPAGE; Invitrogen Corp., Carlsbad, Calif.), which was subsequently treated with Enlightening reagent (Perkin Elmer Life Sciences NEN, Boston, Mass.) for 30 min, dried, and visualized by fluorography.

**Western blotting.** Cytoplasmic cell extracts in radioimmunoprecipitation assay buffer were run through 4 to 12% acrylamide-Bis-Tris gels (NuPAGE; Invitrogen Corp.) and electroblotted onto hybrid enhanced chemiluminescence nitrocellulose membranes (Amersham Pharmacia Biotech Inc., Piscataway, N.J.). The membranes were blocked for 1 h in 3% skim milk in 10 mM Tris-HCl (pH 7.4), 150 mM NaCl, and 0.1% Tween 20 and probed with anti-STAT1 $\alpha/\beta$  (sc-346; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, Calif.), anti-pY-STAT1 (9171; Cell Signaling Technology, Beverly, Ma.), anti-STAT2 (sc-476; Santa Cruz Biotechnology), anti-pY-STAT2 (07-224; Upstate Biotechnology, Lake Placid, N.Y.), anti-PKR (sc-707; Santa Cruz Biotechnology), or anti-SeV C serum. The viral proteins synthesized in the cells were probed with anti-SeV or anti-VSV serum, which was kindly supplied by B. Gotoh (Fukui School of Medicine). Immunoreactivity was detected by the peroxidase-based electrochemiluminescence method using an enhanced chemiluminescence detection reagent (RPN2109; Amersham Pharmacia Biotech) according to the manufacturer's instructions. The reacted bands on the membranes were detected and incorporated digitally by a luminescent image analyzer (LAS-1000 plus; Fuji Photo Film Co., Ltd.,

Tokyo, Japan). The dendrograms of each band were achieved by using the National Institutes of Health Image software and were used for calibrating the relative intensity.

**Antiviral activity of IFNs.** Parental HeLa cells and the wild-type or mutated C- or V-expressing HeLa cells plated at a density of  $5 \times 10^4$  cells per well in 24-well plates were treated with human IFN- $\beta$  or IFN- $\alpha$  at a concentration of 0, 10, 100, or 1,000 IU/ml for 24 h in serum-free DMEM. The cells were washed once with PBS and infected with VSV at a multiplicity of infection of 2 per cell in 0.1 ml of serum-free DMEM for 1 h at 37°C. After removal of the virus-containing media, cells were further incubated in the same medium without IFN until significant cytopathic changes developed in the parental HeLa cells (12 to 24 h). For viral cytopathic effect assays, cells were fixed and stained with Amid Black 10B.

**Reporter gene-expressing activity of rSeV.** The strain Z of recombinant SeV harboring the luciferase gene (rSeV/luci) was inoculated into parental HeLa cells and the wild-type or C<sup>+</sup>-expressing HeLa cells at a multiplicity of infection of 5 per cell in a 6-well plate (25). The infected cells were maintained in serum-free DMEM. The luciferase activities and the protein quantities in rSeV/luci-infected cells were measured at 0, 2, 4, and 6 h postinfection by using a dual luciferase assay kit (Promega, Madison, Wis.) and a protein assay kit (Bio-Rad Laboratories, Hercules, Calif.), respectively.

**Sucrose density-gradient centrifugation of cell lysates.** Cells ( $10^7$  in a 175-cm<sup>2</sup> tissue culture bottle) were harvested from the culture bottle by trypsin and collected by centrifugation at 270  $\times$  g for 10 min. The pellets of cells were lysed on ice with 2 ml of lysis buffer (10 mM sodium phosphate [pH 7.2], 100 mM NaCl, 1% Triton X-100). The resulting cell lysates were centrifuged at 3,000  $\times$  g for 15 min to pellet nuclei and cellular debris. One milliliter of supernatants was layered on the top of a 5 to 35% sucrose density gradient in 10 mM sodium phosphate (pH 7.2), 100 mM NaCl, and 0.1% Triton X-100 and ultracentrifuged with an SW42 (Beckman Coulter Inc., Palo Alto, Calif.) rotor at 38,000 rpm for 16 h at 4°C. The gradients were fractionated from the top to bottom of the tube into 16 fractions of 0.75 ml each.

## RESULTS

**Anti-IFN activity of SeV accessory proteins.** In previous studies it has been shown that SeV C proteins have the ability to inhibit the signal transduction of IFNs (13, 24). On the other hand, many viruses belonging to the subfamily *Paramyxovirinae* have been shown to antagonize IFN(s) via the activity of the V protein. Among them, simian virus 5 (5, 6), mumps virus (31), hPIV2 (40, 42), and Newcastle disease virus (21, 43) do not have the C protein. Even in the measles virus (41, 52, 54) and Nipah virus (47), which have both C and V proteins, a contribution of V protein to IFN antagonism has been reported. The unique C terminus of V proteins is the most conserved protein in the paramyxoviruses and is reported to be required for the antagonism of IFN in simian virus 5 (2), mumps virus (31), and hPIV2 (40). We therefore revisited the SeV V protein to determine whether or not it can antagonize IFNs. Four HeLa cell lines expressing the entire SeV V protein, the V protein with a modified cysteine motif (Vcys), the V unique C terminal region (Vu), or the V/P common region were established (Fig. 1A). The V and Vcys proteins could be immunoprecipitated by both anti-V and anti-P sera. The Vu protein could be precipitated by the anti-V serum but not by the anti-P serum, while the V/P protein could be precipitated by the anti-P serum but not by the anti-V serum. The expression levels of these proteins were almost comparable to that of V protein in the early stage (<12 h) of growth of SeV-infected cells.

To observe the effect of V protein and its derivatives on the establishment of an antiviral state, cells preincubated with IFN- $\beta$  at a concentration of 0, 10, 100, or 1,000 IU/ml for 24 h were challenged with VSV. As shown in Fig. 1B, IFN- $\beta$  alone did not cause any apparent cytopathogenicity in any cells tested under these conditions. All of the cells cultured in the

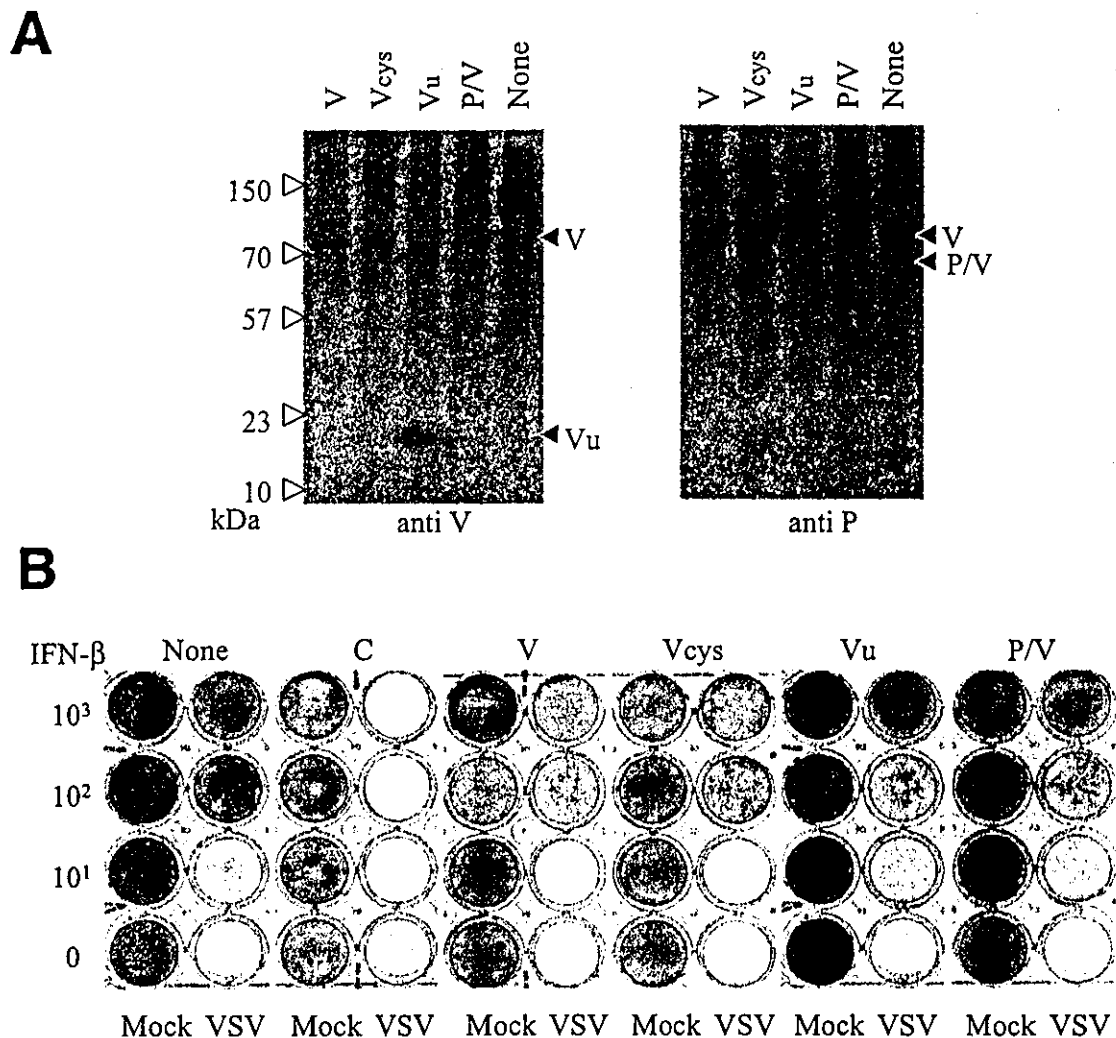


FIG. 1. Establishment of HeLa cell lines expressing the native, mutated, and truncated forms of the SeV V protein and their responses to exogenously added IFN- $\beta$ . (A) The HeLa cell lines expressing the SeV native V protein of 384 aa, P/V common region of 316 aa, V unique frame region of 68 aa (Vu), and a mutant V protein (Vcys) in which two of the seven cysteine residues at positions 362 and 365 were replaced by serine and arginine, respectively, are generated. The individual protein expressions were confirmed by immunoprecipitation by anti-V and anti-P sera. (B) Each cell line was pretreated with various amounts (0 to 10<sup>3</sup> IU/ml) of IFN- $\beta$  for 24 h and then challenged with VSV or left unchallenged (Mock). Anti-VSV action is assessed by the presence of cells attached to the plates. C, cells stably expressing the SeV C protein; None, the parental HeLa cell line expressing none of the SeV proteins.

absence of IFN- $\beta$  were detached from the plates by subsequent VSV infection. The parental HeLa cells were protected from the VSV-induced cytopathic effect by IFN- $\beta$  pretreatments at concentrations of 100 and 1,000 IU/ml. In contrast, HeLa cells expressing SeV C protein were totally detached by VSV infection even after pretreatment with IFN- $\beta$  at a concentration of 1,000 U/ml, as indicated previously (24). However, all cells expressing V, Vcys, Vu, or V/P were protected from VSV infection at IFN- $\beta$  concentrations of 100 and 1,000 U/ml, as seen in the parental HeLa cells. These results confirmed that it was the SeV C protein, but not the V protein, that could antagonize the IFN- $\beta$ . However, the possibility that the SeV V protein would enhance IFN antagonism in combination with the C protein was not excluded.

**Establishment of cell lines expressing the C proteins with the charged amino acid-to-alanine replacements.** We demon-

strated previously that not only the C protein but also the smaller Y1 and Y2 proteins had the ability to both counteract the antiviral effect of IFNs and inhibit viral RNA synthesis (24). Furthermore, the regions responsible for conferring these abilities were mapped to the carboxyl terminal 106-aa region (residues 99 to 204) of the C protein, named Y3, which was common to all C proteins (23). To identify the amino acids in the C protein that are important for counteracting IFNs and for inhibiting viral RNA synthesis, the DNA fragment encoding substitutions of charged amino acids for alanine residues in Cm proteins, which were previously shown to have various L-binding activities and RNA synthesis-inhibiting activities *in vitro* (14), were subcloned into a mammalian expression vector and used to obtain HeLa cell transfectants that constitutively expressed each Cm protein.

The resulting HeLa cell lines were named Cm2, Cm3, Cm4,