

2006280/6A

厚生労働科学研究研究費補助金

新興・再興感染症研究事業

ウイルスベクターを応用したワクチン開発迅速化のための基盤的

技術開発の研究(H16－新興－一般－045)

平成18年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 森本 金次郎

平成19(2007)年 3月

## 目次

I. 総括研究報告	
ウイルスベクターを応用したワクチン開発迅速化のための 基盤的技術開発の研究 主任研究者： 森本金次郎	----- 1
II. 分担研究報告	
1. 狂犬病ウイルスベクターの一アミノ酸置換による病原性復帰の解析 主任研究者： 森本金次郎	----- 2 0
2. フラビウイルス抗原を発現するリコンビナント狂犬病ウイルスの 作製 分担研究者： 高崎 智彦	----- 3 2
3. センダイウイルスベクターの開発および応用に関する研究 分担研究者： 加藤 篤	----- 3 8
4. 麻疹ウイルスベクターの開発および応用に関する研究 分担研究者： 加藤 篤	----- 4 3
5. 現行ワクチンと野外イヌジステンパーウイルス遺伝子系統樹解析 及びリバーズジェネティクスを用いたベクター開発の試み 分担研究者： 加藤 篤	----- 5 1
6. ヘルペスウイルスワクチンの評価法の開発に関する研究 分担研究者： 井上 直樹	----- 5 7
7. サル痘ウイルス Zr-599 株（コンゴ盆地型）と Liberia 株 （西アフリカ型）の霊長類における病原性 分担研究者： 西條 政幸	----- 6 2
8. ウイルス感染における分子パターン（二本鎖 RNA）に対する ミクログリアの形態学的応答様式の解析 主任研究者： 森本金次郎	----- 6 9
9. 狂犬病ウイルスに対する骨髄系樹状細胞の反応 分担研究者： 西園 晃	----- 7 4
10. PGI <sub>2</sub> 合成酵素のプロモーター領域の遺伝子多型は RSV 感染重症化に 関連する（ワクチン開発のための基礎的研究） 分担研究者： 錫谷 達夫	----- 8 9
11. デングウイルスワクチン評価のための小動物感染モデルの構築 分担研究者： 倉根 一郎	----- 1 0 1

## ウイルスベクターを応用したワクチン開発迅速化のための基盤的

### 技術開発の研究

主任研究者：森本金次郎（国立感染症研究所 ウイルス第一部 第三室）

研究要旨：本研究はウイルスベクターを利用することにより、ワクチン開発を迅速化するような基盤的技術開発を行うものである。単独のウイルス感染では困難なワクチン開発における様々なステップ（検査診断技術、ワクチン評価法、抗体産生、弱毒化等）を、ウイルスベクターを利用する等の新たな技術導入により克服することを目指している。また、個々のウイルスでなされた技術を其処に留まることなく広く応用できる技術として捉えながら研究開発を進めていくことである。

本年度の研究において以下の成果が得られた。1) 狂犬病ウイルスベクターの安全性を考えるうえで、重要な問題である。表面糖蛋白質である G 蛋白質の 333 位の一アミノ酸置換における病原性の変化と免疫応答の変化を調べた。2) 抗 IFN 能を失った C 蛋白質に改変したセンダイウイルスを作製し、その性状を解析した。その結果、C 蛋白質は必須ではないが、高い遺伝子発現を持続させるためには、抗 IFN 能は必要であることが示された。3) イヌジステンパーウイルスベクターの開発を目指して、全ゲノム cDNA の構築を行う研究に協力した。4) 麻疹ウイルスベクターの回収に用いるワクチニアウイルスにより引き起こされるアポトーシスを阻害することにより、組換えウイルスの産生の効率が增强することが分かった。5) 外来ウイルス蛋白質発現組換えウイルスとして、日本脳炎ウイルス抗原組換えセンダイウイルスと狂犬病ウイルスの作製を試みた。6) スナネズミがデングウイルス感染の小動物モデルになりうるかを検討した。7) モルモットサイトメガロウイルス (GP-CMV) とモルモットとの感染実験系を評価し、ヒト CMV の動物実験モデル系としての有用性を示した。さらに、GP-CMV の全ゲノム塩基配列の決定を行い、その配列情報をもとにした GP-CMV 特異抗体の作製を行った。8) 新規天然痘ワクチンの有用性を評価するための動物モデルを開発する目的で、サル痘ウイルス Zr-599 株（コンゴ盆地型）と Liberia 株の霊長類における病原性について比較検討し、カニクイザルをモデル動物として新規天然痘ワクチンの有用性を評価するには、コンゴ盆地型サル痘ウイルスを用いるべきであることを示した。

9) 狂犬病ウイルス感染時における樹状細胞の応答を解析し、強毒株と弱毒株における反応の違いを見出した。10) ウイルス感染において普遍的な分子パターンである二本鎖 RNA に対するミクログリアの活性化、とりわけアメーバ型細胞への形態学および構造学的な応答機序を解析した。11) Prostaglandin I<sub>2</sub> (PGI<sub>2</sub>) の Respiratory Syncytial ウイルス (RSV) 感染症における症状軽減効果を RSV 感染マウスモデルで明らかにした。又、月齢 12 ヶ月未満の健常乳幼児において、RSV 感染時の体内での PGI<sub>2</sub> の産生量が RSV 感染症の重症度に関与することが示された。

分担研究者：

井上 直樹 (国立感染症研究所 ウイルス第一部 第四室 室長)  
加藤 篤 (国立感染症研究所 ウイルス第三部 第三室 室長)  
倉根 一郎 (国立感染症研究所 ウイルス第一部 部長)  
西條 政幸 (国立感染症研究所 ウイルス第一部 第一室 主任研究官)  
錫谷 達夫 (福島医科大学 微生物学教室 教授)  
高崎 智彦 (国立感染症研究所 ウイルス第一部 第二室 室長)  
西園 晃 (大分大学医学部 感染分子病態制御講座 教授)

#### A. 研究目的

①狂犬病ウイルスおよびセンダイウイルスを利用したウイルスベクターの開発改良 ②新たな技術を利用したウイルスの検出検査法およびワクチン評価法の開発 ③ウイルス感染による宿主応答機序の解析また、それにより得られた知見を基にしたワクチン開発改良への技術導入 ④コンビナトリアル・ライブラリー法およびファージディスプレイ法を組合せることによりウイルス抗体遺伝子のクローニングによる抗体の作製と検査試薬抗体製剤としての利用。以上の4つの主題で研究を行う。

我々の研究班において、ウイルスベクターとして使用可能な狂犬病ウイルスとセンダイウイルスを用い、外来ウイルス抗原遺伝子を組込んだ組換えウイルスを

作製し、有用なワクチンのないウイルスに対する新たなワクチンの開発を目指した。また、ワクチン開発に不可欠な動物実験モデル系の開発、ワクチン評価法、抗体産生等の新たな技術の開発とその応用を目指している。さらに、ウイルス感染における宿主側の免疫応答機構を解析することにより、その結果をフィードバックし、ウイルス感染の新たな指標となるものの探索、さらに、ウイルスベクターの改良、より安全で有効なワクチン開発への技術導入を行うことを目指している。

ウイルスゲノムを外来遺伝子発現ベクターあるいは組換えワクチンとして使用する場合、その安全性の観点から遺伝子欠損ベクターの利用が有用と考えられている。既に様々な遺伝子欠損ベクターの

開発が行われているセンダイウイルスでは、17年度より、ウイルスの抗インターフェロン能に関与することが知られているC蛋白質の機能欠損センダイウイルスの作製を行い、ベクターとしての有用性を検討している。狂犬病ウイルスベクターにおいては、一アミノ酸の置換で病原性に変化が現れることが既に明らかとなっている。そのG蛋白質の333位のアミノ酸が我々の用いている狂犬病ウイルスベクターにどのような病原性の変化をもたらすかを解析した。さらに、麻疹ウイルスベクターの改良に関する研究とイヌジステンパーウイルスベクターの開発も共同研究として行う。

ウイルスベクターを用いた組換えワクチン開発のモデルとして、すでにワクチンの評価法が確立している日本脳炎ウイルスを抗原として選び、組換え狂犬病ウイルス及び組換えセンダイウイルスを作製し、従来の日本脳炎ワクチンと比較することにより、長所短所を検討することを目指した。デングウイルスやサイトメガロウイルス(CMV)においては有効な感染動物モデル系が存在せず、ワクチンも開発されていないことから、まずは小動物実験モデル系の開発が急がれている。17年度より、デングウイルスに対してはスナネズミの利用を検討している。さらに、CMVは宿主特異性が高くヒトCMVは小動物に感染しないこと、胎盤の構造の違いからマウス・ラットでは先天性CMV感染が起きないことなどから、モルモットとモルモットCMV(GP-CMV)の実験系が有用であることを報告した。しかしながら、GP-CMVゲノムの全塩基配列が決定されていないことや特異的抗体がほとんどない

ことなどが、感染増殖とワクチンの阻害効果を解析する上で障害となっている。そこで、GP-CMVの全ゲノム塩基配列を決めること、及びその配列情報をもとに感染初期に発現される前初期蛋白に対する特異抗体を作製することを行った。これらのウイルスはウイルスベクターを用いた組換えウイルスによるワクチン作製が有効な戦略となる可能性もあり、組換えワクチンを作製し、マウス感染実験による評価の確立も考えている。

生物兵器として天然痘ウイルスが用いられる危険性が指摘され、我が国でも痘そうワクチンの再生産・備蓄が開始されている。我が国で備蓄されている痘そうワクチンはワクチニアウイルスLC16m8株であり、比較的副作用の低いワクチンである。しかし、一般的に痘そうワクチンは脳炎や全身感染症などの副作用を一定の割合で引き起こす。そのため、副作用のない新規天然痘ワクチンの開発が急務である。しかしながら、現在、我が国では天然痘に対する新規ワクチンの評価は不可能である。16年度において、サル痘ウイルスをサルに感染させるモデル系を確立した。今年度はこの系において、サル痘ウイルスZr-599株(コンゴ盆地型)とLiberia株の病原性について比較検討した。

有効なワクチンの開発にはウイルス感染における宿主免疫応答のより明確な理解が必要不可欠である。各種ウイルス感染時における宿主の免疫応答の解析を感染の初期過程に注目して解析している。末梢部位に接種されたウイルス粒子の多くはマクロファージ等の貪食系の細胞に取り込まれ処理される。16年度はマクロ

ファージへの感染及び増殖様式、並びに細胞内シグナル分子の活性化と免疫関連遺伝子の発現誘導を体系的に解析してきた。さらに、ウイルス感染において普遍的に産生される分子構造である二本鎖RNA(dsRNA)を感染刺激のモデルとして、17年度は、dsRNAに対するミクログリアの遺伝子発現応答パターンを明らかにした。18年度の研究では、dsRNAによるミクログリアの形態学的ならびに構造学的な応答における細胞内シグナリングの役割を解析した。さらに18年度は末梢における自然免疫と獲得免疫を仲介するキーパーソンと考えられる樹状細胞を用いて、狂犬病ウイルスの強毒株と弱毒株におけるマウス骨髄系樹状細胞の反応性の違いを検討した。さらに、Respiratory Syncytial ウイルス (RSV) においては、健常乳幼児、各個人によるRSV重篤化の違いはPGI<sub>2</sub>合成酵素(PGIS)プロモーター領域における転写因子結合塩基配列の繰り返し回数(VNTR)の遺伝子多型によるとの仮説を基に、PGISの遺伝子多型と重症化についての検討を行った。

## B. 研究方法

### 組換えウイルスの作製：

狂犬病ウイルス HEP 株完全長 cDNA プラスミド(pHEP)のG蛋白質の333位に相当するコドンにCAGからCGGに点変異を導入することにより、グルタミンからアルギニンに変化させたウイルス cDNA(pHEP<sup>333R</sup>)を作製し、我々のリバーシジェネティクスの系によりウイルス株(rHEPとrHEP<sup>333R</sup>)を作製した。

抗IFN活性を失ったCm\*(K<sup>151</sup>A, E<sup>153</sup>K, R<sup>157</sup>L)をセンダイウイルスのcDNAに導入

したプラスミド pSeV/Cm\*を作製。常法に従って、LLCMK2細胞にT7ポリメラーゼ発現ワクチニアウイルス(vTF7.3)を感染させ、次にpT7-N、-P、-LとpSeV/Cm\*をトランスフェクションし、組換えウイルスSeV/Cm\*を作製した。

日本脳炎ウイルス感染細胞からのRT-PCRにより、C蛋白質(380bp)、C蛋白質からE蛋白質(2381bp)、prM蛋白質からE蛋白質(2000bp)、prM蛋白質からNS1蛋白質(3236bp)、NS1蛋白質(1235bp)、NS3蛋白質(1856bp)の各目的遺伝子をクローニングした。これらの遺伝子を狂犬病ウイルスとセンダイウイルスベクターに導入し、常法に従って、組換えウイルスの作製を行った。

### 実験動物モデル系：ウイルス病原性の解析

サル痘ウイルスのカニクイザル感染実験：10頭のカニクイザル(Macaca fuscicularis)を用いた。10<sup>6</sup> plaque forming unit(pfu)のコンゴ盆地型サル痘ウイルス Zr-599株を、3頭に皮下接種経路(Zr-599-SC群)で、2頭に鼻腔内噴霧経路(Zr-599-IN群)で感染させた。また、10<sup>6</sup> pfuの西アフリカ型Liberia株を3頭に皮下接種経路(Liberia-SC群)で、残りの2頭に鼻腔内噴霧経路(Liberia-IN群)で感染させ、臨床症状の観察およびウイルス学的指標の解析を行った。

センダイウイルス(SeV)の病原性は5週齢の129S6マウス(002045-M, Taconic Farms Inc.)を実験に用いた。麻酔下で10<sup>7</sup>/25 μlの親株SeVまたは変異SeV/Cm\*を経鼻的に感染させた。毎日マウスを観察して体重を測定し、症状が現われたマ

ウスは重篤化する前に安楽殺した。肺の病変は、肉眼的に肺の 1/4 がピンク色から赤に変わっていた場合には「1」、2/4 の場合には「2」、3/4 の場合には「3」、4/4(全域)の場合の場合には「4」と記録した。

狂犬病ウイルスの病原性は 6 週齢 ICR マウスに  $10^5$  ffu/30  $\mu$ l の rHEP 株あるいは rHEP<sup>333</sup>R 株を脳内接種し、14 日間マウスの病態を観察した。50% lethal dose (LD<sub>50</sub>)は連続して 10 倍希釈したウイルス液の接種によるマウスの生死を観察して算出した。

免疫応答メカニズムの解析：

マウス樹状細胞系株 JAWSII、およびマウス神経芽細胞腫由来細胞株 NA に、狂犬病ウイルス固定毒株 Challenge Virus Standard (CVS)および弱毒株 Evelyn Rokitniki Abelsrth (ERA)を用いて解析した。ウイルス接種による JAWSII 細胞表面での抗原提示関連分子の発現の観察は CVS 株 ERA 株いずれも moi=5 で JAWSII 細胞に接種し、72 時間後に細胞を回収・固定し、FACScan により細胞表面分子の解析を行った。FACScan に用いた抗体は、MHC class I, class II, CD40, CCR7 で調べた。又、ウイルス接種後、培養上清中の IFN- $\alpha$ 、IFN- $\beta$ 、TNF- $\alpha$ の産生は ELISA 法にて解析した。

C57BL/6 マウス新生児脳に由来するミクログリア細胞株 MG6-1 を合成 dsRNA である poly(I:C)の存在下で培養し、細胞形態の観察、細胞骨格構造の解析、細胞内シグナル伝達経路の解析、シグナル経路の阻害を調べた。

PGI<sub>2</sub> 合成酵素プロモーター領域の遺伝子多型と PGI<sub>2</sub>の尿中代謝産物測定：

既往歴がなく、RSV 感染症に伴う下気道炎で入院した月齢 0~12 ヶ月の乳幼児 81 人と健康成人 98 人の全血より DNA を精製し VNTR を解析した。また、体内での PGI<sub>2</sub> 産生を検討するために、入院時に尿を採取し、さらに対象として乳児検診で受診した月齢 12 ヶ月未満の児より 20 人の協力が得られ尿を収集した。各全血サンプルより DNA blood Mini Kit (Qiagen)を用い DNA を精製し、PGI<sub>2</sub> 合成酵素のプロモーター領域にある転写因子認識配列の繰り返し回数 (VNTR)を PGI<sub>2</sub> 合成酵素のプロモーター領域を PCR にて増幅し、PCR 産物のサイズを GeneScan (Applied Biosystems)を用いて解析した。実際の PCR 産物のサイズは 3 repeats は 279bp、7 repeats は 315bp となった。PGI<sub>2</sub>代謝物の 2, 3-dinor-6-keto-PGF1 $\alpha$ と TXA2 代謝物の TXB2 の尿中濃度は ELISA キット (R&D)を用いて測定した。尿中代謝物濃度の標準化のために尿中クレアチニンの濃度も測定した (Exocell Inc.)。

(倫理面への配慮)

動物実験は各研究施設の動物実験委員会による審査を受け承認を得た後行われた。ヒト検体を用いる研究は各研究機関の審査を受け倫理委員会の承認を得た後行われた。

## C. 研究結果

ウイルスベクターの開発改良に関して

1) 狂犬病ウイルスベクターの安全性を検証するため、病原性に関与することが知られている表面糖蛋白質である G 蛋白

質の 333 位の一アミノ酸置換を、我々の使用している弱毒狂犬病ウイルスベクターである HEP-Flury 株に導入し、その病原性の変化と免疫応答の変化を調べた。その位置のアミノ酸を強毒型に変えることで、脳内接種での病原性が復帰してくることが明らかとなった。その一アミノ酸置換で脳内の伝播と免疫応答の速さに影響を与えることが分かった。ベクターとして利用するに際し、十分な注意が必要であることを示唆する結果となった。

2) センダイウイルスベクターの安全性を向上するため、17 年度より C 蛋白質の抗インターフェロン活性を解析するとともに、C 蛋白質に変異を導入した抗 IFN 能のないウイルスを作製、その性状を解析した。その結果、C 蛋白質は必須ではないが、高い遺伝子発現を持続させるためには、C 蛋白質のもつ抗 IFN 能が必要であることを明らかにした。

3) 17 年度より麻疹ウイルスベクターの開発に関する研究に協力研している。その結果、高効率組換え麻疹ウイルス合成系の開発に関して、カスパーゼ阻害剤を利用することにより、従来系と比べて、約 1000 倍効率よく麻疹ウイルスを合成できる系を開発した。また、生ワクチン株の性質を規定する分子生物学的基盤の解析に関する研究、麻疹ウイルスの小動物モデルの開発としてマウス SLAM の V ドメインだけをヒト SLAM のものと置き換えたノックインマウスを作製した。

4) イヌジステンパーウイルス (CDV) ベクターの開発の研究にも共同研究として行い。その手始めとして、CDV の全ゲノム cDNA の構築を行っている。

5) 組換えウイルスの発現抗原として、

日本脳炎ウイルスの遺伝子を組込むことを計画した。日本脳炎ウイルス感染細胞からの RT-PCR により、C 蛋白質 (380bp)、C 蛋白質から E 蛋白質 (2381bp)、prM 蛋白質から E 蛋白質 (2000bp)、prM 蛋白質から NS1 蛋白質 (3236bp)、NS1 蛋白質 (1235bp)、NS3 蛋白質 (1856bp) の各目的遺伝子を狂犬病ウイルス及びセンダイウイルスベクターに導入し、組換え狂犬病ウイルス及びセンダイウイルスプラスドを作製した。続いて、組換えウイルスの作製を目指し、目的ウイルス回収実験を行った。残念ながら、現在までに目的組換えウイルスの回収には成功しなかった。現在その原因を検討中である。

実験動物モデル系の開発に関して

6) スナネズミを用いた Dengue ウイルス感染実験において、初感染ではウイルス血症を起こすことはなかったが、異なる血清型の Dengue ウイルスを 3-4 ヶ月後に接種することでウイルス血症を引き起こすことが確認された。TaqMan PCR 実験の結果から、血清中にウイルス RNA が検出された。IgG ELISA の結果から、ウイルスの感染後に有意に Dengue ウイルスに対する抗体価が上昇していることが分かった。

7) ヒト CMV 経胎盤感染の感染動物実験モデルとして、モルモットとモルモット CMV (GP-CMV) 感染実験を行い、その評価のための基礎実験を開始した。しかし、GP-CMV の全ゲノム配列は未決定であること、GP-CMV に対する特異的抗体がほとんどないことなど、このモデルの利用に当たってはいくつかの制約がある。そこで、18 年度は GP-CMV の全ゲノム塩基配列の決定を行い、その配列情報をもとに前初



期蛋白 IE2 をコードする UL122 遺伝子領域が明らかとなった、ヒト CMV の IE2 と相同性が明確な 280 アミノ酸領域を GST 融合蛋白として大腸菌で発現させ、精製後、ウサギに免疫して特異抗体を得た。

8) 16 年度はカニクイザルとサル痘 Liberia 株感染系に、ワクチンとしてワクチニア Lister 株を用いた動物実験系を用いて、痘そうワクチンの動物実験モデルを確立した。その系を利用して、17 年度はさらに血中各種サイトカインレベルの推移を、Multiplex 法を用いて解析した。18 年度はサル痘ウイルス Zr-599 株(コンゴ盆地型)と Liberia 株(西アフリカ型)の霊長類における病原性について比較検討し、霊長類において、コンゴ盆地型サル痘ウイルス Zr-599 株は西アフリカ型 Liberia 株よりも強い病原性を示すことから、カニクイザルをモデル動物として新規天然痘ワクチンの有用性を評価するにはコンゴ盆地型サル痘ウイルスを用いるべきであることを示した。

ウイルス感染とその免疫応答に関する研究として

9) 骨髄系樹状細胞 JAWSII を用いて、狂犬病ウイルス(RV)接種における宿主応答を解析した。CVS 株および ERA 株を接種した JAWSII 細胞では、ウイルス N 蛋白質を発現した細胞はほとんど認められなかった。この結果から、JAWSII 細胞は RV 感染に対して非感受性を示すことが分かった。CVS 株を接種した JAWSII 細胞の培養上清中と、ERA 株を接種した JAWSII 細胞の培養上清中を比較した場合、ERA 株を接種した時の方が TNF- $\alpha$ 、IFN- $\alpha$  および IFN- $\beta$  において、高濃度の値を示した。細胞内に

おける CVS 株と ERA 株の反応性が異なっている事が示された。

10) 17 年度よりミクログリア細胞株を用いて、二本鎖 RNA (dsRNA) に対する初期応答をサイトカインおよびケモカイン、接着分子、細胞傷害因子等の遺伝子群を標的とした定量 PCR を行い、ミクログリアにおける遺伝子発現の時間的、量的な変動パターンを調べている。18 年度の研究では、dsRNA によるミクログリアの形態学的ならびに構造学的な応答における細胞内シグナリングの役割を解析し、アメーバ型細胞への形態学および構造学的な応答機序を明らかにした。

11) マウスモデルにおいて、RSV 感染時に Prostaglandin I<sub>2</sub> (PGI<sub>2</sub>) の症状軽減効果が明らかである。PGI<sub>2</sub> 合成酵素 (PGIS) のプロモーター領域内に、転写因子認識配列の繰り返し回数 (VNTR: variable number of tandem repeat) の遺伝子多型がある。RSV 感染時の体内での PGI<sub>2</sub> の産生量が RSV 感染症の重症度に関連し、PGI<sub>2</sub> の産生は PGIS の VNTR の遺伝子多型に関連することが示された。ヒトにおいても RSV 感染時の体内での PGI<sub>2</sub> の産生量が RSV 感染症の重症度に関与することが示された。

#### D. 考察

RNA ウイルスベクターは高増殖の細胞質内ウイルスベクターとしてその有用性が期待されている。遺伝子発現ベクターあるいは組換えワクチンとして利用するうえでの利点としては①ゲノム構造が単純で遺伝子操作が容易である、②細胞質で増殖し、宿主染色体との組換え組込みがない、③広い宿主細胞に感染可能であ

る等が挙げられる。しかしながら、ウイルスベクターを外来抗原発現ベクターとして応用する際には、その効果および安全性の面での更なる改良が望まれる。もう一つの特徴として、ウイルスゲノムに突然変異や遺伝子欠損を導入することで、容易に伝播性・病原性の欠失が可能であることが挙げられる。

ウイルスベクターは当初ウイルスのゲノムをすべて残したままで、外来遺伝子を付加的に挿入する自立増殖型としてスタートした。しかし、単純にベクターによる物質生産を目指すのであれば、増えたウイルスが他に広がりえるという性質は問題ではないが、安全性の面から考えると、必ずしも自立増殖型がいいとは限らない。そこで、ウイルスゲノムの転写複製に関係しない遺伝子を除き、それらをヘルパー細胞株から供給するという欠損型ベクターの開発へと進展してきた。センダイウイルスの場合、P 遺伝子からは P 蛋白質に加え、V と C 蛋白質が発現される。近年、C 蛋白質による抗 IFN 作用が明らかになってきた。本研究において、抗 IFN 能を失った C 蛋白質に改変したウイルスを作製し、その性状を解析した。その結果、C 蛋白質は必須ではないが、高い遺伝子発現を持続させるためには、抗 IFN 能は必要であることが示された。このことは、一方でウイルスベクターを持続的に発現させるためには、細胞の IFN 系を止めておかねばならないことを示している。培養細胞レベルの使用に関しては、問題は生じないが、個体を対象にした使用の場合には、IFN 系を止めてしまうことの是非について、十分に考慮する必要がある。

狂犬病ウイルスベクターにおいては、遺伝子欠損ベクターの利用に関する研究はまだ十分でないが、本研究において P 遺伝子欠損ウイルスのワクチン開発を行ってきた。ウイルスは、様々な様式でインターフェロン (IFN) に対抗する能力を獲得している。モノネガウイルスにおいて P 遺伝子がウイルスの IFN 発現阻止機構を担っているという知見が蓄積されてきており、狂犬病ウイルスにおいても IFN 誘導阻止が P 遺伝子により制御されていることが明らかになっている。センダイウイルスや狂犬病ウイルスなどの IFN の発現制御機構がウイルスベクターの遺伝子発現あるいはワクチンとしてのウイルス抗原の発現とその免疫応答にどのような影響を与えるかを解析し、どのように利用すれば適切であるかを検討する必要がある。組換えウイルスの使用目的がワクチンとしての使用か遺伝子発現ベクターとしての使用かによりベクターの適切な選択が必要となる。使用目的に応じたベクターの改良も考慮に入れなければならない。我々の作製した P 遺伝子欠損狂犬病ウイルスは増殖欠損ウイルスであるにも関わらず、予想以上の免疫原性を示した所見はこの IFN 発現阻止機構が欠損していることが一因かもしれない。

ワクチン開発におけるウイルスベクターを用いる利点の一つとして、免疫応答を解析した様々な基礎的実験より得られた知見を取り入れ、優れた免疫増強効果が挙げられるようなベクターの構築を容易に可能にすることである。ウイルスあるいは二本鎖 RNA によるマクロファージや樹状細胞の活性化を解析し、あるいはウイルス感染によるインターフェロン発

現阻止機構を解析することにより、より有効なワクチンの改良への新たな道筋を開くことになると思う。

ウイルスベクターを用いたワクチン開発のモデルとして、すでにワクチンの評価法が確立している日本脳炎ウイルス遺伝子をもつ組換え狂犬病ウイルスとセンダイウイルスの作製を目指し、従来の日本脳炎ワクチンと比較して、長所短所を検討する予定であった。しかしながら、狂犬病ベクターとセンダイウイルスベクターの両者において、組換えウイルスの回収実験を数回行ったが、組換えウイルスの回収は成功しなかった。その原因は現在検討中であるが、まず、第一に考えられることは(-)RNAウイルスである狂犬病ウイルスやセンダイウイルスと(+)RNAウイルスである日本脳炎ウイルスの遺伝子を組込んだことにより、ゲノム構造上何らかの阻害作用が働いていることが考えられる。

デングウイルスやヒトサイトメガロウイルス(CMV)に対しては有効な動物実験モデル系が存在しないことから、ワクチンの開発が遅れている。まずは本研究において検討したような小動物実験モデル系の開発が急がれている。また、痘そうワクチン開発のために欠かせない霊長類を用いた感染動物モデルを確立したが、小動物を用いた痘そうワクチン評価システムの開発も欠かせない。小動物としてマウスを用いたワクチン評価系には組換えウイルスの利用も選択の一つである。

狂犬病ウイルスの病原性の異なる CVS 株と ERA 株において樹状細胞に対する反応性が大きく異なる事が判明した。樹状細胞はウイルスの末梢感染において重要

な役割を担っている事が推測されている。この反応性の違いは致命的病態を誘導する強毒株と致命的病原性の減衰した弱毒株の病態形成機序を解明するヒントに成り得ると考える。一方、RSV 感染においては骨髄由来の樹状細胞において、 $PGI_2$  のアナログは抗原提示能を抑制し、さらに樹状細胞の分化を抑制することが知られている。RSV 感染時に誘導産生されてくる  $PGI_2$  が免疫系を修飾し最終的に抗炎症的に働き、一方で血管内皮細胞の保護や血小板凝集抑制により炎症局所での循環を保ち、肺浮腫への進展を防止すると考えられている。RSV 感染後に誘導されてくる  $PGI_2$  の多寡が RSV による肺炎、気管支炎の病態にも深く関与することが推測されている。さらに本研究において、PGIS プロモーター領域の VNTR の repeat の数が多い遺伝子多型の組み合わせを持つ児ほど、RSV 感染時の体内での  $PGI_2$  の産生量が多く、一方で症状は軽度であることが示された。このことはこれまでの動物実験や細胞レベルでの知見からも矛盾しない結果である。

## E. 結論

本年度の研究において以下の点が明らかとなった。

1) 狂犬病ウイルスベクターの安全性を考えるうえで、重要な問題である。表面糖蛋白質である G 蛋白質の 333 位の一アミノ酸置換における病原性の変化と免疫応答の変化を調べた。一アミノ酸の変化が脳内での伝播と免疫応答の速さに影響を与えることが分かった。2) 抗 IFN 能を失った C 蛋白質に改変したセンダイウイルスを作製し、その性状を解析した。その結果、C 蛋白質は必須ではないが、高い

遺伝子発現を持続させるためには、抗IFN能は必要であることが示された。3) 麻疹ウイルスベクターの回収に用いるワクチニアウイルスにより引き起こされるアポトーシスを阻害することにより、組み換えウイルスの産生の効率が增强することが示された。4) イヌジステンパーウイルスベクターの開発に協力し、完全長ゲノムcDNAの構築を行った。5) 日本脳炎ウイルスのC蛋白質、C蛋白質からE蛋白質、prM蛋白質からE蛋白質、NS1蛋白質、NS3蛋白質の各領域を増幅し、各目的遺伝子をそれぞれ狂犬病ウイルス及びセンダイウイルスベクターに導入し、日本脳炎ウイルス抗原組換え狂犬病ウイルスとセンダイウイルスの作製を試みた。残念ながら、組換えウイルスの産生には至らなかった、現在その原因を検討中である。6) スナネズミを用いたデングウイルス感染実験において、初感染ではウイルス血症を起こすことはなかったが、異なる血清型のデングウイルスを3-4ヶ月後に接種することでウイルス血症を引き起こすことが確認された。TaqMan RT-PCR実験の結果から、血清中にウイルスRNAが検出された。IgG ELISAの結果から、ウイルスの感染後に有意にデングウイルスに対する抗体価が上昇していることが分かった。7) モルモットサイトメガロウイルス(GP-CMV)とモルモットとの感染動物実験系を評価した。さらに、GP-CMVの両末端領域を除くほぼ全領域の塩基配列を決定した。8) 痘そうワクチンを含む新規に開発される天然痘ワクチンを評価するには、霊長類にコンゴ盆地型サル痘ウイルスを皮下接種経路で感染させる系が望ましいことが示された。9) ウイルス感染において共通の分子パターンに対するミクログリアの形態学的な細胞応答には、JNKを介したシグナル伝達経路が必要であることを示した。10) 狂犬病ウイ

ルス感染における末梢樹状細胞の応答を解析した結果、弱毒株は強毒株と比べ炎症系サイトカインを協力的に誘導することが分かった。11) Respiratory Syncytial Virus (RSV)感染症の重症度とプロスタグランジン<sub>2</sub> (PGI<sub>2</sub>)合成酵素プロモーター領域の多型の関連性を調べ、RSV感染症の重症度とPGI<sub>2</sub>の産生量が関連していることが分かった。

F. 健康危険情報  
なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Ito-Takayama, M., Inoue, K., Shoji, Y.,

Inoue, S., Iijima, T., Sakai, T., Kurane, I., Morimoto, K. A highly attenuated rabies virus HEP-Flury strain reverts to virulent by single amino acid substitution to arginine at position 333 in glycoprotein. *Virus Res.* 119: 208-215 (2006)

Khawplod, P., Shoji, Y., Ubol, S., Wilde, H., Mitmoonpitak, C., Nishizono, A., Kurane, I., Morimoto, K. Genetic analysis of dog rabies viruses circulating in Bangkok. *Infection, Genetics and Evolution* 6: 235-240 (2006)

Nakamichi K, Saiki M, Kitani H, Kuboyama Y, Morimoto K, Takayama-Ito M, Kurane I. Suppressive effect of simvastatin on interferon-beta-induced expression of CC chemokine ligand 5 in microglia. *Neuroscience Letters* 407(3): 205-210 (2006)

Nakamichi K, Saiki M, Kitani H, Kuboyama Y, Morimoto K, Takayama-Ito M, Kurane I. Roles of NF-kappaB and

- MAPK signaling pathways in morphological and cytoskeletal responses of microglia to double-stranded RNA. *Neuroscience Letters* 414(3): 222-227 (2007)
- Fujita S, Eguchi A, Okabe J, Harada A, Sasaki K, Ogiwara N, Inoue Y, Ito T, Matsuda H, Kataoka K, Kato A, Hasegawa M, and Nakanishi M.: Sendai virus-mediated gene delivery into hepatocytes via isolated hepatic perfusion. *Biol Pharm Bull.* 29(8): 1728-1734 (2006)
- Goto, T., M. Morishita, K. Nishimura, M. Nakanishi, A. Kato, J. Ehara, and K. Takayama. Novel mucosal insulin delivery systems based on fusogenic liposomes. *Pharmaceutical Research* 23: 384-391 (2006)
- Kiyotani K, Sakaguchi T, Kato A, Nagai Y, Yoshida T.: Paramyxovirus Sendai virus V protein counteracts innate virus clearance through IRF-3 activation, but not via interferon, in mice. *Virology* 359: 82-91 (2007)
- Kato A, Kiyotani K, Kubota T, Yoshida T, Tashiro M, and Nagai Y.: Importance of anti-Interferon capacity of the Sendai virus C protein for pathogenicity in mice. *J. Virol.* (in press, 2007)
- Tahara, M., Takeda, M., Seki, F., Hashiguchi, T., Yanagi, Y. Multiple amino acid substitutions in hemagglutinin are necessary for wild-type measles virus to acquired the ability to use receptor CD46 efficiently. *J Virol.* [Epub ahead of print] Dec 20 (2006)
- Ohno, S., Ono, N., Seki, F., Takeda, M., Kura, S., Tsuzuki, T., Yanagi, Y. Measles virus infection of SLAM (CD150) knock-in mice reproduces tropism and immunosuppression in human infection. *J Virol.* 81: 1650-1659 (2006)
- Nakatsu, Y., Takeda, M., Ohno, S., Koga, R., Yanagi, Y. Translational inhibition and increased interferon induction in cells infected with a C protein-deficient measles virus. *J Virol.* 80: 11861-11867 (2006)
- Nakatsu, Y., Takeda, M., Kidokoro, M., Kohara, M., Yanagi, Y. Rescue system for measles virus from cloned cDNA driven by vaccinia virus Lister vaccine strain. *J Virol Methods.*137: 152-155 (2006)
- Takeda, M., Nakatsu, Y., Ohno, S., Seki, F., Tahara, M., Hashiguchi, T., Yanagi, Y. Generation of measles virus with a segmented RNA genome. *J Virol.* 80: 4242-4248 (2006)
- Seki, F. Takeda, M., Minagawa, H., Yanagi, Y. The recombinant wild-type measles virus containing a single N481Y substitution in its hemagglutinin cannot use a receptor CD46 as efficiently as that having the hemagglutinin of the Edmonston laboratory strain. *J Gen Virol.* 87: 1643-1648 (2006)
- Yanagi, Y., Takeda, M., Ohno, S. Measles virus: cellular receptors, tropism and pathogenesis. *J Gen Virol,* 87: 2767-2779 (2006)
- Yanagi, Y. Takeda, M., Ohno, S., Seki, F. Measles virus receptors and tropism. *Jpn J Infect Dis,* 59: 1-5 (2006)

- Lan NT, Yamaguchi R, Inomata A, Furuya Y, Uchida K, Sugano S, and Tateyama S.: Comparative analyses of canine distemper viral isolates from clinical cases of canine distemper in vaccinated dogs. *Vet. Microbiol.* 115(1-3): 32-42 (2006)
- Lan NT, Yamaguchi R, Kawabata A, Uchida K, Kai K, Sugano S, and Tateyama S.: Stability of canine distemper virus (CDV) after 20 passages in Vero-DST cells expressing the receptor protein for CDV. *Vet. Microbiol.* 116 (in press, 2007)
- Kaneko H, Kawana T, Kuremiya E, Suzutani T.: Tolerance of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) against a culture medium and biological substances. *J. Biochem. Biophys. Methods* (2006)
- Ogawa H, Baba Y, Suzutani T, Inoue N, Fukushima E, Oomori K.: Congenital cytomegalovirus infection diagnosed by polymerase chain reaction with the use of preserved umbilical cord in sensorineural hearing loss children. *Laryngoscope* 116: 1991-1994 (2006)
- Wang G-Q, Suzutani T, Yamamoto Y, Fukui Y, Nozawa N, Schmid DS, Kurane I, Inoue N.: Generation of a reporter cell line for the detection of infectious varicella-zoster virus and its applications for antiviral studies. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50: 3142-3145 (2006)
- Seishima M, Fujisawa T, Yamanaka S, Ishii N, Mori S, Ohashi K, Suzutani T.: BCG granuloma appearing more than 50 years after vaccination. *Arch. Dermatol.* 142: 249-250 (2006)
- Zhou W, Hashimoto K, Moore ML, Elias JA, Zhu Z, Durbin J, Colasurdo G, Rutigliano JA, Chiappetta CL, Goleniewska K, O'Neal JF, Graham BS, Peebles RS.: IL-13 is associated with reduced illness and replication in primary respiratory syncytial virus infection in the mouse. *Microbes Infect.* 8(14-15): 2880-9 (2006)
- N. Kumar, K. McLean, N. Inoue, D.R. Moles, C. Scully, S.R. Porter, C.G. Teo.: Herpesvirus 8 genoprevalence in people at disparate risks of Kaposi's sarcoma. *J. Med. Virol.* 79: 52-59 (2007)
- H. Ogawa, T. Suzutani, Y. Baba, S. Koyano, N. Nozawa, K. Ishibashi, K. Fujieda, N. Inoue, K. Omori.: Etiology of severe sensorineural hearing loss in children: independent impact of congenital cytomegalovirus infection and GJB2 mutations. *J. Infect. Dis.* 195: 782-788 (2007)
- H. Katano, Y. Sato, Y. Tsutsui, T. Sata, A. Maeda, N. Nozawa, N. Inoue, Y. Nomura, T. Kurata.: Pathogenesis of cytomegalovirus-associated labyrinthitis in a guinea pig model. *Microbes Infect.* 9: 183-191 (2007)
- N. Nozawa, S. Koyano, Y. Yamamoto, Y. Inami, I. Kurane, N. Inoue.: A real-time PCR assay using specimens on filter discs as a template for detection of cytomegalovirus in urine. *J. Clin. Microbiol.* (in press, 2007)
- Otsu S., K. Gotoh, T. Yamashiro, J. Yamagata, K. Shin, T. Fujioka, A. Nishizono: Transfer of Antigen-Pulsed Dendritic Cells Induces

- Specific T-Cell Proliferation and a Therapeutic Effect against Long-Term *Helicobacter pylori* Infection in Mice. *Infection and Immunity* 74(2): 984-993 (2006)
- Minoura-Etoh J., K. Gotoh, R. Sato, M. Ogata, N. Kaku, T. Fujioka, A. Nishizono: *Helicobacter pylori*-associated oxidant monochloramine induces reactivation of Epstein-Barr virus(EBV) in gastric epithelial cells latently infected with EBV. *Journal of Medical Microbiology* 55: 905-911 (2006)
- Saijo M, George-Courbot MC, Fukushi S, Mizutani T, Philippe M, Georges AJ, Kurane I, Morikawa S. Marburgvirus nucleoprotein-capture enzyme-linked immunosorbent assay using monoclonal antibodies to recombinant nucleoprotein detection of authentic Marburgvirus. *Japanese Journal of Infectious Diseases* 59: 323-325 (2006)
- Saijo M, Ami Y, Suzaki Y, Nagata N, Iwata N, Hasegawa H, Ogata M, Fukushi S, Mizutani T, Sata T, Kurata T, Kurane I, Morikawa S. Highly attenuated vaccinia vaccine, LC16m8, lacking B5R membrane protein expression protects monkeys from monkeypox. *Journal of Virology* 80: 5179-5188 (2006)
- Saijo M, Niikura M, Ikegami T, Kurane I, Kurata T, Morikawa S. Laboratory diagnostic systems for Ebola and Marburg hemorrhagic fevers developed with recombinant proteins. *Clinical and Vaccine Immunology* 13: 437-443 (2006)
- Mizutani T, Fukushi S, Ishii K, Sasaki Y, Kenri T, Saijo M, Kanaji Y, Shirato K, Kurane I, Morikawa S. Mechanism of establishment of persistent SARS-CoV-infected cells. *Biochemical and Biophysical Research Communication* 347: 261-26 (2006)
- Fukushi S, Mizutani T, Saijo M, Kurane I, Morikawa S. Evaluation of a vesicular stomatitis virus pseudotype-based assay for detection of valuable for SARS-CoV neutralizing antibody responses to SARS-CoV. *Journal of Medical Virology* 78: 1509-1512 (2006)
- Mizutani T, Fukushi S, Iizuka D, Inanami O, Kuwabara M, Takashima H, Yanagawa H, Saijo M, Kurane I, Morikawa S. Inhibition of cell proliferation by SARS-CoV infection in Vero E6 cells. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 46: 236-243 (2006)
- Mizutani T, Fukushi S, Saijo M, Kurane I, Morikawa S. Regulation of p90RSK phosphorylation by SARS-CoV infection in Vero E6 cells. *FEBS Letter* 580: 1417-1424 (2006)
- Shirato K, Nishimura H, Saijo M, Okamoto M, Noda M, Tashiro M, Taguchi F. Diagnosis of human respiratory syncytial virus infections using reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP). *Journal of Virological Methods* 139: 78-84 (2007)
- Ike F, Bourqade B, Sato H, Saijo M, Kurane I, Morikawa S, Yamada Y, Jaubert J, Berard M, Nakata H, Hiraiwa N, Mekada K, Takakura A, Itoh T, Obata Y, Yoshiki A,

- Montagutelli X. LCMV infection in a wild-derived mouse inbred strain undetected by dirty bedding sentinel health monitoring and revealed after embryo transfer. *Comparative Medicine* (in press, 2007)
- Mizutani T, Fukushi S, Kenri T, Sasaki Y, Endoh D, Zamoto A, Saijo M, Kurane I, Morikawa S. Enhancement of cytotoxicity against Vero E6 cells persistently infected with SARS-CoV by Mycoplasma fermentans. *Archives of Virology* (in press, 2007)
- Nagata N, Iwata N, Hasegawa H, Fukushi S, Yokoyama M, Harashima A, Sato Y, Saijo M, Morikawa S, Sata T. Participation of both host and virus factors in induction of severe acute respiratory syndrome in F344 rats infected with SARS coronavirus. *Journal of Virology* (in press, 2007)
- Hamano, M., Lim, C.K., Takagi, H., Sawabe, K., Kuwayama, M., Kishi, N., Kurane, I., Takasaki, T. Detection of antibodies to Japanese encephalitis virus in the wild boars in Hiroshima prefecture, Japan. *Epidemiology and Infection* 12: 1-4, (2007)
- Mizutani, T., Endoh, D., Okamoto, M., Shirato, K., Shimizu, H., Arita, M., Fukushi, S., Saijo, M., Sakai, K., Lim, C.K., Ito, M., Nerome, R., Takasaki, T., Ishii, K., Suzuki, T., Kurane, I., Morikawa, S., Nishimura, H. A new system for rapid genome sequencing of emerging RNA viruses. *Emerging Infectious Diseases* (in press, 2007)
- 加藤 篤 シンプル微生物学 改訂第4版 パラミクソウイルス 東 匡伸、小熊恵二編集 pp269-272 南江堂 2006年5月
- 竹田誠、柳雄介 リバーズジェネティクスと麻疹ウイルス 福岡医学雑誌 97: 140-145 (2006)
- 西條政幸 ウイルス講座「天然痘」 感染制御 2: 342-346 (2006)
- 西條政幸 根絶されたはずの天然痘の今 小児科臨床 60: 149-154 (2007)
- 井上直樹、野澤直樹 HCMV のゲノム構造と遺伝子機能 日本臨床 64 巻増刊号 3: 377-385 (2006)
- 野澤直樹、井上直樹 CMV の先天性感染機構 日本臨床 64 巻増刊号 3: 446-450 (2006)
- 小泉加奈子, 中島由紀子, 松崎真和, 小井戸則彦, 大曾根康夫, 林 昌宏, 高崎智彦, 倉根一郎, 秋月哲史 本邦で初めて確認されたウエストナイル熱の輸入症例 感染症学雑誌 80(1): 56-57 (2006)
- 林 昌宏, 倉根一郎 ウエストナイル熱・脳炎の流行状況 臨床と微生物 33(4): 393-398 (2006)
- 林 昌宏, 倉根一郎 ウエストナイル熱・脳炎 *Pharma Medica* 24(8): 15-20 (2006)
2. 学会発表
- K. Morimoto. Rabies situations in the world – the virus structure, pathogenesis, diagnosis and control. 中国狂犬病防疫研究会 南京市 中国 May 2006
- K. Morimoto. Rabies detection. Academic conference on Rabies in 2006, Beijing,



October 26, 2006

Takeda, M., Hashiguchi, T., Nakatsu, Y., Ohno, S., Seki, F., Tahara, M., Yanagi, Y. Generation of measles virus having segmented RNA genome. 13th International Conference on Negative Strand Viruses. Salamanca, Spain, June 2006

Takeda, M., Nakatsu, Y., Ohno, S., Seki, F., Tahara, M., Hashiguchi, T., Yanagi, Y. Mononegavirus-derived vectors having genetically engineered three RNA genome segments. Keystone Symposia, Cell Biology of Virus Entry, Replication and Pathogenesis. Santa Fe, New Mexico, USA, February 2006

Chen, B., Takeda, M., Lamb, R. A. Influenza virus hemagglutinin (H3) requires palmitoylation of its cytoplasmic tail for assembly: M1 proteins of two subtypes differ in their ability to support assembly. Keystone Symposia, Cell Biology of Virus Entry, Replication and Pathogenesis. Santa Fe, New Mexico, USA, February 2006

Nakatsu, Y., Takeda, M., Ohno, S., Koga, R., Yanagi, Y. The 6th Awaji International Forum on Infection and Immunity. Awaji Island, Hyogo, Japan, September 2006

Ohno, S., Ono, N., Seki, F., Takeda, M., Yanagi, Y. The 6th Awaji International Forum on Infection and Immunity. Awaji Island, Hyogo, Japan, September 2006

Saijo M., Georges-Courbot MC, Fukushi S, Mizutani T, Marianneau P, Georges AJ, Kurane I., Romanowski V, Morikawa S. Recombinant nucleoprotein-base diagnosis

of Lassa fever-antibody and antigen detection systems. Filoviruses: Recent advances and future challenges, An ICID global conference, Winnipeg, Canada, September 2006

Saijo M., Ami Y, Suzuki Y, Nagata N, Iwata N, Hasegawa H, Ogata M, Fukushi S, Mizutani T, Sata T, Kurata T, Kurane I., Morikawa S. Highly attenuated vaccinia vaccine, LC18m8, lacking B5R membrane protein expression protects monkeys from monkeypox. 12th International Conference of Infectious Diseases, Lisbon, Portugal, June 2006

Yokote H, Shinmura Y, Satou A, Kanehara T, Ohkuma K, Oka T, Funatsu A, Morikawa S, Saijo M., Kurane I., Kurata T, Hashizume S. Safety and efficacy of attenuated smallpox vaccine LC16m8 in animals. 12th International Conference of Infectious Diseases, Lisbon, Portugal, June 2006

Yokote H, Shinmura Y, Kanehara T, Ohkuma K, Oka T, Funatsu A, Morikawa S, Saijo M., Kurane I., Kurata T, Hashizume S. Safety and efficacy study of attenuated smallpox vaccine LC16m8 in animals. ASM Biodefence Research Meeting, Washington DC, USA, February 2006

N. Inoue., T. Suzutani., H. Ogawa, S. Koyano, Y. Baba, H. Yan, K. Ishibashi, Y. Yamamoto, Y. Inami, N. Nozawa, K. Omori, K. Fujieda, I. Kurane. Epidemiology of congenital CMV infection in pediatric patients with severe sensorineural hearing loss: prevalence, viral loads, and genotypes. The 31st International Herpesvirus Workshop,

Seattle, 2006

C. Lim, T. Takasaki, A. Kotaki, R. Nerome,  
M. Ito, S. Tajima, K. Morita, T. Ishikawa, I. Kurane. Mouse Antibody Response to Inactivated West Nile and Inactivated Japanese Encephalitis Vaccines for Immunization against West Nile virus and other Flaviviruses. 2006 National Conference on West Nile Virus in the United States, San Francisco, Feb. 23-24 2006

竹田誠 麻疹ウイルス遺伝子操作系の確立と複製および病原性発現の分子基盤の解析 第54回日本ウイルス学会 名古屋 2006年11月

大野真治、小野伸之、関文緒、竹田誠、柳雄介 ヒトSLAM ノックインマウスの麻疹ウイルス感染の解析 第54回日本ウイルス学会 名古屋 2006年11月

中津祐一郎、竹田誠、木所稔、小原道法、柳雄介 Lister ワクチン株由来 T7 RNAポリメラーゼ発現組えワクシニアウイルス L0-T7-1 を用いた cDNA からの高効率組換え麻疹ウイルス作出系の確立 第54回日本ウイルス学会 名古屋 2006年11月

中津祐一郎、竹田誠、大野真治、柳雄介 ウイルス感染における麻疹ウイルス C タンパク質の役割 第54回日本ウイルス学会 名古屋 2006年11月

田原舞乃、竹田誠、柳雄介 麻疹ウイルスマトリックス (M) 蛋白質によるウイルス伝播様式の制御機構 第54回日本ウイルス学会 名古屋 2006年11月

田原舞乃、竹田誠、柳雄介 麻疹ウイル

スマトリックス (M) 蛋白質によるウイルス増殖の細胞特異性制御機構 第43回日本ウイルス学会九州支部総会 久留米 2006年9月

中津祐一郎、竹田誠、大野真治、古賀律子、柳雄介 麻疹ウイルス C タンパク質による IFN 経路の阻害・第43回日本ウイルス学会九州支部総会 久留米 2006年9月

西條政幸、網康至、須崎百合子、永田典代、岩田奈織子、長谷川秀樹、緒方もも子、福士秀悦、水谷哲也、倉根一郎、佐多徹太郎、倉田毅、森川茂 サル痘ウイルス Zr-599 株 (コンゴ盆地型) と Liberia 株 (西アフリカ型) の霊長類における病原性 第54回日本ウイルス学会学術集会 名古屋 2006年11月

西條政幸、錫谷達夫、水田克巳、倉根一郎、森川茂 チミジンリン酸化酵素遺伝子の1番目と45番目のコドンに存在するメチオニンの中に終始コドンが存在する HSV-1 の薬剤感受性 第54回日本ウイルス学会学術集会 名古屋 2006年11月

野沢直樹、古谷野伸、倉根一郎、井上直樹 尿・唾液などの液体試料を塗布した濾紙片を直接使用したリアルタイムPCR法の開発:尿中のCMV検出を実例として 第54回日本ウイルス学会学術集会 名古屋市 2006年11月

橋本浩一、細矢光亮、片寄雅彦、佐久間弘子、坂田宏、鈴木仁 RSV 感染症入院患児における PGI2 合成酵素の遺伝子多型の検討 第109回日本小児科学会学

術集会 金沢 2006年4月21-23日  
橋本浩一、森修一、細矢光亮、錫谷達夫  
RSVに対する siRNA の in vitro、in vivo  
における検討 第16回抗ウイルス化学  
療法研究会 福島市 2006年5月26-27  
日  
隅越誠、橋本浩一、細矢光亮、佐久間弘  
子、錫谷達夫、鈴木仁 ヒトインフルエ  
ンザウイルスのヒト血管内皮細胞への  
感染とアポトーシス誘導 第47回日本  
臨床ウイルス学会 東京 2006年6月  
3-4日  
橋本浩一、森修一、細矢光亮、錫谷達夫  
RSV ゲノムに対する siRNA の in vitro、  
in vivo における検討 第38回小児感  
染症学会 高知 2006年10月10-11日  
橋本浩一、細矢光亮、錫谷達夫 RSV 感染  
症入院患児における PGI<sub>2</sub> 合成酵素の遺  
伝子多型の検討 第60回日本細菌学会  
東北支部会総会 福島市 2006年8月  
24-25日  
橋本浩一、細矢光亮、石橋啓、金子久俊、  
錫谷達夫 PGI<sub>2</sub> 合成酵素の遺伝子多型  
と RSV 感染重症化との関連 第54回日  
本ウイルス学会学術集会 名古屋  
2006年11月19-21日  
橋本浩一 ウイルス感染と気管支喘息—  
最近の知見 第18回日本アレルギー学  
会春季臨床大会教育セミナー 東京  
2006年5月31日

濱野正敬、林昌宏、高木弘隆、澤邊京  
子、桑山勝、岸昇、高崎智彦、倉根  
一郎 広島県内の野生イノシシにおけ  
る日本脳炎ウイルスに対する抗体保有

状況 第141回日本獣医学会学術集会  
つくば市 2006年3月18-20日  
原田文植、高崎智彦、高木弘隆、林昌宏、  
伊藤美佳子、倉根一郎 日本人デング熱  
患者における抗ウエストナイルウイル  
ス交差中和抗体に関する検討 第80回  
日本感染症学会 2006年4月  
高崎智彦、小滝徹、根路銘令子、林昌  
宏、伊藤美佳子、田島茂、倉根一郎 本  
邦原因不明脳炎・無菌性髄膜炎における  
日本脳炎ウイルス関与に関する回顧的  
調査 第41回日本脳炎ウイルス生態学  
研究会 2006年5月  
林昌宏、高崎智彦、根路銘令子、伊藤  
美佳子、田島茂、森田公一、石川豊数、  
倉根一郎 日本脳炎ウイルス中和抗体  
保有マウスのウエストナイル不活化ワ  
クチンによる免疫応答の検討 第54回  
日本ウイルス学会 2006年11月  
井本淳一、石川知弘、村上賢二、林昌宏、  
濱野正敬、高崎智彦、倉根一郎、小西英二  
ブタにおける日本脳炎 DNA ワクチンお  
よびタンパクワクチンの混合投与によ  
る中和抗体の誘導 第54回日本ウイル  
ス学会 2006年11月

H. 知的財産権の出願・登録状況  
なし

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	ページ	出版年
<u>Ito-Takayama, M.</u> , Inoue, K., Shoji, Y., Inoue, S., Iijima, T., Sakai, T., <u>Kurane, I.</u> , <u>Morimoto, K.</u>	A highly attenuated rabies virus HEP-Flury strain reverts to virulent by single amino acid substitution to arginine at position 333 in glycoprotein.	Virus Research	119	208-215	2006
<u>Saijo M.</u> , George-Courbot MC, Fukushi S, Mizutani T, Philippe M, Georges AJ, <u>Kurane I.</u> , Morikawa S.	Marburgvirus nucleoprotein-capture enzyme-linked immunosorbent assay using monoclonal antibodies to recombinant nucleoprotein detection of authentic Marburgvirus.	Japanese Journal of Infectious Diseases	59	323-325	2006
<u>Saijo M.</u> , Ami Y, Suzaki Y, Nagata N, Iwata N, Hasegawa H, Ogata M, Fukushi S, Mizutani T, Sata T, Kurata T, <u>Kurane I.</u> , Morikawa S.	Highly attenuated vaccinia vaccine, LC16m8, lacking B5R membrane protein expression protects monkeys from monkeypox.	Journal of Virology	80	5179-5188	2006
<u>Saijo M.</u> , George-Courbot MC, Fukushi S, Mizutani T, Philippe M, Georges AJ, <u>Kurane I.</u> , Morikawa S.	Marburgvirus nucleoprotein-capture enzyme-linked immunosorbent assay using monoclonal antibodies to recombinant	Japanese Journal of Infectious Diseases	59	323-325	2006