

厚生労働科学研究費補助金

肝炎等克服緊急対策研究事業

培養細胞で感染複製および粒子形成が可能な  
C型肝炎ウイルス株を利用したワクチン開発

平成17～19年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 脇田 隆字 (平成17、18年度)  
石井 孝司 (平成19年度)

平成20(2008)年 3月

## 目次

### I. 総括研究報告

- 培養細胞で感染複製および粒子形成が可能なC型肝炎ウイルス株を  
利用したワクチン開発 . . . . . 1  
脇田 隆字

### II. 分担研究報告

1. HCV の感染中和アッセイ系の確立、ウイルス不活化法の開発、  
ワクチン免疫 . . . . . 31  
脇田 隆字
2. ウイルス様中空粒子の開発およびバイオリアクターによる  
ウイルス粒子産生細胞の培養 . . . . . 53  
石井 孝司
3. ウイルス粒子大量調整法と精製法の開発 . . . . . 61  
望月 英典

### III. 研究成果の刊行に関する一覧表 . . . . . 69

### IV. 研究成果の刊行物・別冊 . . . . . 75

# I. 総括研究報告

総括研究報告書

# 培養細胞で感染複製および粒子形成が可能なC型肝炎ウイルス株を 利用したワクチン開発

主任研究者 国立感染症研究所・ウイルス第二部 部長 脇田 隆宇 （平成17-18年度）  
国立感染症研究所・ウイルス第二部 主任研究官 石井 孝司 （平成19年度）

研究要旨 C型肝炎ウイルス（HCV）のワクチン開発が進まなかった最大の理由は、培養細胞でウイルスが感染増殖できなかつたことである。我々が分離した JFH-1 株により初めてHCVのウイルス培養が可能となった。本研究では、HCVの感染中和アッセイ系を樹立し、リコンビナントウイルス粒子産生系やウイルス様中空粒子産生系によるワクチン開発を試みた。培養細胞で作製したウイルス粒子を精製し、マウスに免疫することにより感染中和活性の誘導を観察することができた。

分担研究者 石井 孝司（平成17-18年度）

国立感染症研究所  
主任研究官

チンの効果も期待されるので、HCVのワクチン開発が望まれている。

分担研究者 望月 英典

東レ株式会社医薬研究所  
研究主幹

これまでにHCVのワクチン開発が進まなかった大きな理由の1つは、培養細胞でウイルスが感染増殖できなかつたためである。Lohmannらが Con1株のHCVレプリコンを開発して以来、培養細胞でHCV複製に関する研究が可能となった。しかし、Con1株のHCV全長遺伝子を導入したレプリコンでもウイルス粒子は分泌されなかつた。一方、我々が劇症肝炎患者から分離したJFH-1株は、これまでのHCV株と比較して培養細胞における複製能力が非常に高く、このJFH-1株の合成全長RNAを培養細胞に導入することにより感染性のウイルス粒子を分泌した。

分担研究者 脇田 隆宇（平成19年度）

国立感染症研究所  
部長

そこで本研究では、JFH-1株によるウイルス感染系を用いて、ウイルス感染中和アッセイ系を樹立し、JFH-1株によるリコンビナントウイルス粒子産生系によるワクチン開発を試みた。これ

## A. 研究目的

未だに多くのC型肝炎ウイルス（HCV）感染者が世界中に存在する。HCV感染は持続感染化し、肝細胞癌を発症する重大な感染症である。しかし、インターフェロンおよびリバビリンによる治療効果は不十分である。輸血用血液のスクリーニングにより新規感染者数は減少しているが、医療従事者などのハイリスクグループに予防的ワクチンが必要である。また、治療用ワク

は世界で初めての native HCV 粒子を用いたワクチン開発である。

3 年間の本研究においてリコンビナントウイルス粒子を大量に回収、精製する方法を開発した。精製ウイルス粒子をマウスに免疫して感染中和活性の誘導を確認できた。また HCV の Virus like particle を作製することができた。

## B. 研究方法

### 1. 培養細胞におけるウイルス感染系

感染性のウイルス粒子を作成できる実験系を用いてウイルス培養系の樹立を目指した。全長の合成ウイルス RNA を培養細胞中に導入してウイルス粒子を回収した。培養液を濃縮して感染用ウイルス液とした。HCV RNA コピー数、HCV コア蛋白量、および感染力価を測定した。感染価は Huh7 細胞にウイルス液の段階希釈液を感染させて、感染細胞数と感染スポット数を免疫染色により定量した。

### 2. 感染中和活性測定系

Luciferase 遺伝子をレポーターにもつレプリコンを作製した。このレポーターウイルス感染系に HCV 感染系に感染中和活性を持つと考えられる材料を添加して感染効率の変化を観察した。さらにウイルス感染系の実験で確立したウイルス感染力価測定系を用いて同様に中和活性を定量的に測定した。

Native ウイルス粒子の場合は、希釈した血清とウイルス液を混合し、1 時間 37°C にて培養し、あらかじめ培養した Huh7 に加え、3 時間培養した。血清/ウイルス液を除き、洗浄後、新鮮培地を加え 48 時間培養した。その後、Isogen を加

えて、total RNA の抽出した。total RNA を用いた定量的 RT-PCR により total RNA 1  $\mu$ g あたりの HCV RNA の copy 数を測定した。

### 3. ウイルス粒子の精製法の確立と改良

シードウイルスを高感受性 Huh7 細胞に感染させて継代培養した。感染細胞を通常の細胞培養用大型フラスコの 5-10 倍の培養面積を持つセル・スタックチャンバーにて培養し、ウイルス粒子を含む培養液を回収した。限外ろ過、しょ糖密度遠心、ヘパリンカラムを段階的に組み合わせることにより、ウイルス粒子の精製法を確立した。

さらに精製法を改良するため、ウイルス培養に用いる培養液中の FCS 濃度について検討した。回収したウイルス培養液を様々な膜による限外濾過を試みた。

### 4. 精製ウイルスの性状解析とマウスへの免疫

精製ウイルス液中に含まれるウイルス粒子を形態学および生化学的に解析した。電子顕微鏡によりウイルス粒子形態を観察した。蛋白質電気泳動および質量分析によりウイルス粒子とともに存在する蛋白質を同定した。さらに精製ウイルス粒子液をアジュバントと共にマウスに免疫した。

### 5. JFH-1 株の構造遺伝子領域を発現する組換えワクチニアウイルスの取得

JFH-1 株の構造遺伝子領域を PCR 法により増幅し、ワクチニアウイルストランスファーベクターに挿入した。高度弱毒ワクチニアウイルス Dis 株が唯一増殖できる細胞株であるニフト

リ胎児線維芽細胞に、構築したトランスファーベクターを導入し、その後に DIs 株を導入細胞に感染させて細胞内で homologous recombination をおこさせた。選択し、取得した組換えウイルスを哺乳類細胞に感染させ、目的とする JFH-1 株の構造蛋白が発現していることを確認した。本ウイルスをヒト肝臓由来細胞株である Huh7 に感染させ、培養上清を濃縮してシヨ糖密度勾配遠心で分画し、HCV 構造蛋白の培養上清中での挙動を調べた。

#### 6. JFH-1 株の構造遺伝子領域を恒常的に発現する哺乳動物細胞株の取得

pEF ベクターは、EF プロモーターと Zeocin 耐性遺伝子を持ち、目的蛋白を恒常的に発現する哺乳動物細胞株を作成することができる。本ベクターの EF プロモーターの下流に JFH-1 株の構造遺伝子領域を挿入し、エレクトロポレーション法で Huh7 細胞に導入し、Zeocin でスクリーニングして HCV 構造蛋白を恒常的に発現する細胞株を取得した。培養上清を濃縮してシヨ糖密度勾配遠心で分画し、HCV 構造蛋白の培養上清中での挙動を調べた。

#### 7. 粒子中に HCV replicon を保持する HCV-LPs の形成とその感染性の確認

上記の HCV 構造蛋白を発現するプラスミドを、HCV の subgenomic replicon を保持する Huh7 細胞に同様に導入し、Zeocin でスクリーニングして HCV 構造蛋白を恒常的に発現する細胞株を取得した。培養上清を濃縮してシヨ糖密度勾配遠心で分画し、HCV 構造蛋白と replicon RNA の培養上清中での挙動を調べた。精製した HCV-LPs

を naive な Huh7 細胞に感染させ、G418 を添加した培地で2週間培養し、コロニー形成の有無を調べた。

#### 8. インターフェロン誘導系が阻害された細胞でのレプリコン複製能の検討

Huh7 細胞に IRF-3 ドミナントネガティブ発現ベクターを導入し、ハイグロマイシン耐性クローンを選択した。樹立したドミナントネガティブ型 IRF-3 発現 Huh7 細胞株の IFN- $\beta$  および IFN- $\gamma$  の反応性はそれぞれ、pISRE-Luc および pGAS-Luc をレポーター遺伝子として使用して解析した。

#### 9. 突然変異誘発剤による HCV レプリコン高複製能細胞株の取得

$4 \times 10^5$  個の Huh7 細胞を 10%FCS 含有 D-MEM (以下、D-MEM+10F と略す) にて培養し、フレームシフト型突然変異誘発剤である ICR-191 を含む D-MEM+10F に置換後、2時間培養した。細胞を洗浄後、D-MEM+10F にて培養を続けた。その後細胞を1個/well となるように 96well プレートに播種し、独立した 70 個のクローンを得た。

ICR191 にて処理して得られたクローンに HCV レプリコン RNA を導入し、48 時間後にルシフェラーゼ活性を測定した。

#### 10. HCV 感染に係わる宿主因子の解析

JFH-1 株、HCV は従来の Huh7 細胞にのみ感染可能だがその感染効率は 1% 以下と低い。感染感受性の異なる細胞株の混在を考慮して、Huh7 細胞を限界希釈法によりクローニングして亜細胞株を得た。亜細胞株を HCV

感染性、レプリコンの複製感受性、細胞表面マーカーの解析を行った。

#### 11. マイクロキャリアによるHCV感染細胞の培養

細胞培養系でのHCV粒子大量生産を目指し、HCV感染細胞のマイクロキャリアによる培養を検討した。

#### 12. JFH-1以外の株 (Genotype 1bを含む)由来の構造蛋白をもつキメラウイルスの作製および精製と、精製キメラウイルスのマウスへの免疫

我が国および欧米諸国においてHCVの主要な遺伝子型は1型である。現在感染性の確認されているウイルス株はJFH-1株のみで、その遺伝子型は2aである。そこで、JFH-1以外の株由来の構造領域遺伝子に組み換えたキメラウイルスの作製を試みた。JFH-1以外の株として、遺伝子型1bのTH1株、遺伝子型2aのJ6CF株を用いた。キメラウイルスをそれぞれ、TH/JFH-1、J6/JFH-1とした。

細胞培養系でのHCV粒子大量生産を目指し、キメラウイルス感染細胞をマイクロキャリア(サイトデックス)、多段式培養器(セルスタック)および高密度細胞培養システム(BelloCell)で培養を検討した。

限外濾過、密度勾配遠心、ヘパリンクロマトグラフィーを組み合わせた方法で精製した。ウイルス量は定量的RT-PCRおよびコアタンパク質のEIAにて測定した。

紫外線照射にて不活化した部分精製J6/JFH-1(HCV core 70 pmol 相当)をフロイントの完全

アジュバントに加え、エマルジョンを形成させ、腹腔内投与により免疫した。1週間おきに2回フロイントの不完全アジュバントにてエマルジョンを形成させ、同様に腹腔内へ追加免疫した。最初の免疫から62日目に採血し、血清をEIAによるE2タンパク質への反応性評価およびHCV中和価の測定に用いた。

#### (倫理面への配慮)

各種研究材料の取り扱い及び組換えDNA実験は、適切な申請を行い承認を受ける。また、本研究で使用するヒト由来試料はすでに樹立された細胞株であり倫理面での問題はないと考えられるが、新たにヒト組織などを使用する必然性が生じた場合には、文部科学省等でまとめられた「ヒトゲノム、遺伝子解析研究に関する倫理指針」及び、平成13年3月29日付12文科振第266号文部科学省研究振興局長通知に則り、当該研究機関の医学研究倫理審査委員会に申請し、インフォームドコンセントに係る手続きを実施し、提供試料、個人情報厳格に管理保存する。

#### C. 研究結果

##### 1. HCVのウイルス感染実験系

JFH-1の全長RNAを導入した細胞から分泌されたウイルス粒子はHuh7細胞に感染性があった。その感染効率を向上させるために感染の標的細胞にHuh7細胞の亜細胞群を用いた。Huh7.5.1細胞および米国スクリプス研究所から導入されたHuh7細胞(Huh7S)を用いた。両細胞株共に当研究室由来のHuh7細胞よりもはるかに感染効率が良いことが判明した。ウイルス感染細胞を継

代培養することが可能で、ほぼ100%感染した状態で1ヶ月以上細胞を維持することが可能であった。

Huh7.5.1細胞あるいはHuh7S細胞を用いてウイルス感染力価の測定が可能となった。顕微鏡下にinfectious focusを計測して、感染力価を定量化した。培養上清中のウイルス粒子は4度あるいは-70度において一定の期間安定であることが判明した。

培養上清中のHCVをチンパンジーに感染させた。チンパンジーに対する感染力価を同定するために最大希釈(1万倍希釈液)から段階的に濃いウイルス液を接種したところ、1000倍希釈のウイルス液接種により、一過性のウイルス血症を発症したが、肝炎は発症しなかった。また、持続感染化はなく、抗体反応も検出できなかった。これはJFH-1株の病原性の問題やあるいは感染時のウイルス量の問題があると考えられた。

また、最近開発されたヒト肝細胞を移植したキメラマウスに培養上清中のJFH-1ウイルスを感染させたところ感染が成立した。マウス血清中のウイルスタイターは $10^4$ - $10^5$  copies/ml程度であった。このマウスに感染したウイルスの遺伝子配列などについて解析を進めている。

## 2. 感染中和活性測定系

レポーターウイルスによる中和実験でHCVに持続感染している患者血清中に感染中和活性が存在することを確認した。遺伝子型1および2の血清がともに遺伝子型2aのウイルスであるJFH-1株のウイルス感染を中和することが判明した。さらに感染力価測定系を用いて、抗E2

モノクローナル抗体に感染中和活性があることを証明できた。

また、nativeウイルス粒子の感染実験の場合には感染細胞のウイルスRNAコピー数のリアルタイムRT-PCRによる精密な測定により感染阻害活性を測定することが可能となった。

## 3. ウイルス粒子の精製法の確立

JFH-1株またはJ6/JFH-1キメラウイルス株の合成RNAをHuh7細胞にトランスフェクションしてシードウイルスを回収した。このシードウイルスをHuh7細胞またはHuh7.5.1細胞に感染させて継代培養した。ウイルス粒子を含む培養液を回収するために、感染細胞を通常の細胞培養用大型フラスコの5-10倍の培養面積を持つセル・スタックチャンバーにて継代培養した。さらにウイルス液に含まれる蛋白量を減らすために、培養液回収にはFCS濃度を2%の培養液を使用した。回収したウイルス液はまずフィルターで濾過して、細胞のデブリスなどを取り除いた後に、分子量カットオフ100kDの限外ろ過膜を用いて低分子の夾雑物を除去すると同時に濃縮した。この濃縮ウイルス液中のウイルス分画をしょ糖密度遠心法により回収した。さらに感染性ウイルスを吸着するヘパリンカラムによりウイルス粒子をさらに精製した。精製前の原液と比較して、2000倍から8000倍程度の精製が可能となった。

ウイルス培養の際に培養液中のFCS濃度を10%、5%、2%、1%、0.5%、0%として培養を継続しウイルス産生量を比較した。2%FCSまではウイルス量は低下しなかったが、1%以下のFCSではウイルス産生量が低下した。しかし、ウイ



ルス産生量は半分程度に低下するものの FCS 無添加でも数日間であればウイルス培養が可能なのが判明した。従って無血清培養によるウイルス産生の可能性が示された。培養液中に分泌されたウイルス粒子を効率よく回収するために、最初の精製は限外濾過が最も効率がよいと考えられる。ウイルスをなるべくロスせずに夾雑タンパク質を取り除く膜を選択することが必要である。カットオフが 100kDa、300kDa、500kDa の膜を比較したところ、300kDa の膜を使用することによりウイルスをほとんどロスすることなくウイルス液を濃縮し低分子夾雑物を濾過することができた。

#### 4. 精製ウイルスの性状解析とマウスへの免疫

精製ウイルスを電子顕微鏡により観察すると、直径 50-60 nm の球状粒子を観察できた。さらに免疫電顕法により、ウイルス表面蛋白質に対する抗体がこの球状ウイルス粒子に吸着することが明らかとなった。また、精製ウイルス液を SDS-PAGE によりゲルに展開した後、SYPRO Ruby で染色し、同定したバンドを切り出し、質量分析によりウイルス粒子とともに存在する蛋白質を同定した。多くは細胞由来のタンパク質であった。これらのタンパク質がウイルス粒子内にあるのか、ウイルス粒子の外側に付着しているのかを検討している。

精製ウイルス粒子をアジュバントと共にマウスに免疫した。アジュバントと混和することによりウイルスの感染性が不活化されることを確認後、マウスに投与した。複数回の投与後、マウス血清中に E1 および E2 に対する EISA 抗体の上昇を検出できた。さらに、このマウス血清

は培養細胞における HCV の感染阻害活性を有することが明らかとなった。

#### 5. JFH-1 株の構造遺伝子領域を発現する組換えワクチニアウイルスの取得

組換え DIIs を哺乳動物細胞に感染させ、目的とする JFH-1 株の構造蛋白が発現していることを確認した。培養上清から DIIs 粒子を除いた後に濃縮し、ショ糖密度勾配で分画したところ、密度が 1.15 前後の画分にコア蛋白が存在したことから、発現した構造蛋白が粒子様構造を形成している可能性が示唆された。また、HCV のレプリコンを保持する Huh7 細胞に同様に組換え DIIs を感染させ、同様に培養上清を濃縮してショ糖密度勾配で分画すると、コア蛋白の存在する画分にレプリコン RNA が存在していることが判明した。この RNA は RNase 処理で抵抗性を示し、粒子様構造の中に含まれている可能性が示唆された。レプリコン細胞は genotype 1b のものを用いたが、構造蛋白領域は genotype 1a、1b、2a を用いた。蛋白分泌量では 2a(JFH-1) が最も良好であった。

#### 6. JFH-1 株の構造遺伝子領域を恒常的に発現する哺乳動物細胞株の取得

JFH-1 株の構造領域遺伝子を pEF4 の EF プロモーターの下流に挿入し、Huh7 細胞に導入した。目的蛋白を発現している細胞株を選択したところ、培養上清にも HCV 構造蛋白が分泌されることが確認された。また、培養上清を濃縮してショ糖密度勾配で分画したところ、密度が 1.15 付近にコア蛋白が存在していることが確認され、HCV の粒子様構造物が形成されている可

能性が示唆された。

#### 7. 粒子中に HCV replicon を保持する HCV-LPs の形成とその感染性の確認

Genotype 1b の subgenomic replicon を保持する Huh7 細胞に JFH-1 の構造蛋白を恒常的に発現するプラスミドを導入した細胞株を樹立した。この株からは構造蛋白と replicon RNA が分泌され、蔗糖密度勾配で分画したところ、構造蛋白と RNA は比重が 1.15 前後の分画に回収された。この画分の構造蛋白と RNA の大部分がヘパリンカラムに結合したことから、構造体を形成していることが示唆された。この実験で得られた構造体は粒子中に HCV replicon を保持していると考えられるため、もし感染性を有するなら感染した細胞に replicon が導入される。導入された replicon が複製することにより、感染細胞は neomycin 耐性を有することになる。上記の画分を naive な Huh7 細胞に感染させ、G418 存在下で培養したところ耐性コロニーが検出された。このことから、上記の画分に存在する構造体は感染性を有する HCV-LPs であることが明らかとなった。

#### 8. インターフェロン誘導系が阻害された細胞でのレプリコン複製能の検討

IFN 遺伝子転写誘導誘導に関与する IRF-3 を不活化するために、恒常的にドミナントネガティブ型 IRF-3 を発現する細胞株を作製した。

ドミナントネガティブ型 IRF-3 恒常発現細胞では HCV レプリコンの複製が持続し、複製能の向上が示唆された。これらのクローンの中には IFN- $\beta$  に対する反応性の変化が認められた。

#### 9. 突然変異誘発剤による HCV レプリコン高複製能細胞株の取得

フレームシフト型突然変異誘発剤である ICR191 にて処理した細胞からクローン化した細胞に HCV レプリコン RNA を導入し、その複製能をルシフェラーゼ活性で検出した。その結果、親株と比較して、複製能が 4-6 倍高いクローンを得た。

#### 10. HCV 感染に係わる宿主因子の解析

従来の Huh7 細胞から限界希釈法により 70 クローンの亜細胞株を得た。HCV の感染性を比較すると親株よりも最大 10 倍程度まで感染性の良いクローンや感染性のより低い細胞株、さらに感染性の全くない細胞株が存在することが明らかとなった。次にルシフェラーゼ遺伝子を持つレプリコンによる HCV 遺伝子の複製感受性を検討すると、複製感受性も様々な程度の細胞株が存在したが、感染感受性と複製感受性の間に相関関係はなかった。そこで、HCV の感染性に関与することが報告されている細胞表面マーカーを解析した。CD81, SR-B1, LDLr について検討すると、CD81 の発現の有無が亜細胞株の感染感受性と相関していることが明らかとなった。つまり、CD81 の発現がある細胞株は感染感受性があり、CD81 の発現のない細胞株では感染性が見られなかった。さらにレプリコンによる解析により、CD81 を発現していない細胞は複製感受性が高かった。そこで、CD81 を発現せず、感染感受性の無い細胞株 (Huh7-25) に CD81 発現プラスミドのトランスフェクションにより、CD8

1 を強制発現すると感染感受性が回復した。さらに CD81 を持続して発現する細胞株を樹立した (Huh7-25-CD81)。この Huh7-25-CD81 はこれまでに報告された Huh7.5.1 などの細胞よりも高い感染感受性を示し、ウイルス培養に適した細胞株であることが明らかとなった。

#### 11. マイクロキャリアによる HCV 感染細胞の培養

ウイルスを大量に取得するためには HCV 感染細胞を平面培養するよりもマイクロキャリア上で細胞を培養して、スピナー培養を行うことで、効率よく、高濃度のウイルス培養液を取得できると考えられる。そこで前項で樹立した Huh7-25-CD81 をマイクロキャリア上に培養する条件を検討した。しかし、至適条件下で Huh7-25-CD81 をマイクロキャリア上で培養し、HCV を感染させると、細胞増殖が停止して培養液中のウイルス産生量があまり増加しないことが明らかとなった。そこで、ウイルス感染細胞の培養条件の至適化を試みている。

#### 12. JFH-1 以外の株 (Genotype 1b を含む) 由来の構造蛋白をもつキメラウイルスの作製および精製と、精製キメラウイルスのマウスへの免疫

遺伝子型 1b の HCV 株である J1 株、Con1 株、TH 株および遺伝子型 2a の HCV 株である J6CF 株の構造領域遺伝子を JFH-1 株の全長遺伝子に組み換えて、キメラウイルス遺伝子を作製した。全長 RNA を合成して、Huh7-25-CD81 細胞にトランスフェクションして、ウイルス産生を検討した。これらのキメラウイルスの中で、TH/JFH-

1 および J6/JFH-12 種類のキメラウイルスは持続的にウイルスが産生され、Huh7 細胞に感染性を示した。ウイルスを大量に取得するために、3 種類の培養系を検討した。まず、Huh7-25-CD81 をマイクロキャリア上に培養する条件を検討した。しかし、至適条件下で Huh7-25-CD81 をマイクロキャリア上で培養し、HCV を感染させると、細胞増殖が停止して培養液中のウイルス産生量があまり増加しないことが明らかとなった。また、高密度細胞培養システム (BelloCell) に行ったが、HCV に感染した細胞の増殖は悪く、ウイルス生産量は上がらなかった。これらに対して、単純な平面培養系である多段式培養器 (セルスタック) が最もウイルスが得られた。

J6/JFH1 を限外濾過膜、密度勾配遠心、ヘパリンクロマトグラフィーおよび限外濾過膜による濃縮、バッファー置換の工程にて精製を行った。

E2 タンパク質を固相化した EIA にて、正常マウス血清と比較して、J6/JFH-1 粒子で免疫したて得られたマウスの血清は、900 倍希釈で有意に E2 タンパク質に反応した。さらに、HCV 感染系にて評価したところ、免疫血清には 20 倍希釈で 85% の J6/JFH-1-HCV の感染を阻害する活性が認められた。さらに本血清は、20 倍希釈で 65% の TH/JFH-1 の感染を阻害する活性が認められた。この結果は、遺伝子型 2a の HCV を免疫して誘導される抗体中には遺伝子型 1b の HCV の感染を阻害する抗体が存在することを示している。

#### D. 考察

HCV のワクチン開発が進んでこなかった理由は HCV のウイルス培養系が存在しなかつ

たことである。JFH-1 株を用いた実験系により感染性ウイルスを用いた実験が可能となった。

ウイルス粒子を含む培養液を大量に調整して、ウイルス粒子を精製する方法を構築した。現在の方法によって約2000倍から8000倍程度の精製が可能である。ウイルス粒子の精製法の確立はワクチン開発に必須であるとともに、HCV粒子の性状解析にも非常に重要である。精製法をさらに改善していくことと、ウイルス培養時によりタイターの高い培養方法を用いることにより、より精製度の高いウイルス液が得られることは他のウイルスの例からも明らかである。従って、より効率の良いウイルス培養法の開発はHCVのワクチン開発に重要である。精製ウイルス粒子の観察によりウイルス粒子の可視化が可能となった。さらに精製度を高めて、ウイルス粒子の構造解析へつなげていくことが期待される。ウイルス粒子の構造解析は新たな抗ウイルス薬開発につながる可能性もある。また、ウイルス粒子液中に含まれる蛋白質を同定すると多くの細胞性蛋白質が同定された。この結果からはウイルス液の精製度がまだ不十分なことが推測されるとともに、ウイルス粒子に様々な細胞性蛋白質が吸着、または粒子中に含まれていることが示唆された。従って、ウイルスの精製度をより向上させて、特異的にウイルス粒子と共存する細胞性蛋白質を同定することが重要である。この解析はウイルス粒子の生成過程に関与する宿主因子の解明につながることを期待できる。

精製ウイルス粒子を用いてマウスの免疫を開始した。JFH-1 株あるいはキメラウイルスの免疫後、マウスの血清中にはHCVのエンペロー

ブタンパク質に対して特異的な抗体を産生されていることをELISA法により確認することができた。さらに、精製ウイルスにより免疫したマウスの血清中に感染中和活性が確認できた。この結果は今後のHCVに対するワクチン開発にとってきわめて重要である。ウイルス粒子を用いた免疫により、どのような抗体が誘導されるかを検討する必要がある。強い中和活性を持つ抗体が誘導されれば、モノクローナル抗体の樹立も試みる必要がある。また、ウイルス株間や遺伝子型間における交差中和活性も今後の検討課題である。

さらに本研究では、HCVのsubgenomic repliconを保持する細胞に構造蛋白をtransに供給し、一過性の感染はおこるが増殖はしないHCVのvirus-like particlesの作成に成功した。HCVの構造蛋白を供給する方法として、組換えワクチニアウイルスを用いる方法と薬剤耐性プラスミドを用いる方法の2つを検討したが、組換えウイルスを用いた場合には精製したHCV-LPsにワクチニアウイルスが少量ではあるが混入するため、VLPの感染性を検討することが困難であった。従って薬剤耐性プラスミドをsubgenomic repliconを保持する細胞に導入する方法を最終的に採用した。その結果、構造蛋白が培養上清中に分泌されることが確認され、この構造蛋白はショ糖密度勾配遠心でnativeなHCV粒子と類似の比重の画分に集積した。また、同じ画分からsubgenomic replicon RNAも検出された。さらにこのHCVのvirus-like particleの感染性を確認することができた。virus-like particleは感受性細胞に一過性に感染し、細胞内で増殖しない。このような粒子は感染性は有するが増

殖せず、HCV 蛋白をすべて感染細胞内で発現するため、HCV に対する免疫を誘導する上で安全かつ理想的であり、優れたワクチンとして用いることができると考えられる。また、構造蛋白や replicon RNA に変異を入れ、粒子形成に重要な部分の解析を行うことも検討している。

Huh7 細胞をクローニングすることにより、親細胞株中には感染感受性の異なる亜細胞株が混在していることが明らかとなった。感染感受性を決定する重要な宿主因子は細胞表面の CD 8 1 分子であった。また、ウイルス複製感受性は逆に CD 8 1 発現の無い亜細胞株で高いものが見られた。そこで、CD 8 1 を強制発現して得られた Huh7-25-CD81 細胞は感染感受性が高く、ウイルス培養に適していると考えられた。HCV の感染感受性にはさらに多くの宿主因子が関与していると考えられている。最近では肝細胞のタイトジャンクションに発現する Claudin-1 という分子が HCV 感染に重要であることが報告された。従って、関与する宿主因子の発現を調整することにより感染感受性をコントロールできると考えられる。また、ウイルス粒子を大量に取得するために、より効率の良い感染細胞培養法を開発する必要がある。

異なる遺伝子型の感染性ウイルス粒子を取得することは HCV ワクチン開発において重要である。ウイルス粒子産生効率の良い遺伝子型 1 b のキメラウイルスを作製することができた。培養細胞に適したウイルスゲノム配列を明らかにすることができた。

#### E. 結論

3 年間にわたる本研究は下記に記す多くの成

果をあげた。これまで困難と考えられていた、C 型肝炎ウイルスに対するワクチン開発の可能性を開く大きな意義がある。しかし、C 型肝炎ウイルスに対するワクチン開発はまだその緒についたばかりであり、今後もより一層の研究の進展が望まれる。

1. JFH-1 株およびキメラウイルスの大量培養法および精製法を樹立した。
2. C 型肝炎ウイルスの感染中和活性測定系を樹立した。
3. 精製ウイルス粒子をマウスに免疫し、特異的抗体の誘導と感染中和活性を検出した。
4. Virus like particle の作製に成功し、その感染性を確認できた。
5. C 型肝炎ウイルスのワクチン開発に必要なその他の基礎的研究を行った。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Tasaka M, Sakamoto N, Itakura Y, Nakagawa M, Itsui Y, Sekine-Osajima Y, Nishimura-Sakurai Y, Chen CH, Yoneyama M, Fujita T, Wakita T, Maekawa S, Enomoto N, Watanabe M. Hepatitis C virus non-structural proteins responsible for suppression of the RIG-I/Cardif-induced interferon response. J Gen Virol. 2007 88:3323-33.
2. Zeisel MB, Koutsoudakis G, Schnober EK, Haberstroh A, Blum HE, Cosset FL, Wakita T, Jaeck D, Doffel M, Royer C, Soulier E, Schvoerer E, Schuster C, Stoll-Keller F, Bartenschlager R, Pietschmann T, Barth H, Baumert TF. Scavenger receptor class B type I is a key host factor for hepatitis C virus infection

required for an entry step closely linked to CD81. *Hepatology*. 2007 46(6):1722-1731.

3. Sekine-Osajima Y, Sakamoto N, Mishima K, Nakagawa M, Itsui Y, Tasaka M, Nishimura-Sakurai Y, Chen CH, Kanai T, Tsuchiya K, Wakita T, Enomoto N, Watanabe M.

Development of plaque assays for hepatitis C virus-JFH1 strain and isolation of mutants with enhanced cytopathogenicity and replication capacity. *Virology*. 2007 Oct 18; [Epub ahead of print]

4. Ariumi Y, Kuroki M, Abe K, Dansako H, Ikeda M, Wakita T, Kato N. DDX3 DEAD-box RNA helicase is required for hepatitis C virus RNA replication. *J Virol*. 2007 81(24):13922-6.

5. Miyanari Y, Atsuzawa K, Usuda N, Watashi K, Hishiki T, Zayas M, Bartenschlager R, Wakita T, Hijikata M, Shimotohno K. The lipid droplet is an important organelle for hepatitis C virus production. *Nat Cell Biol*. 2007 Sep;9(9):1089-97.

6. Delgrange D, Pillez A, Castelain S, Cocquerel L, Rouillé Y, Dubuisson J, Wakita T, Duverlie G, Wychowski C. Robust production of infectious viral particles in Huh-7 cells by introducing mutations in hepatitis C virus structural proteins. *J Gen Virol*. 2007 88(Pt 9):2495-503.

7. Kim CS, Jung JH, Wakita T, Yoon SK, Jang SK. Monitoring the antiviral effect of alpha interferon on individual cells. *J Virol*. 2007 81(16):8814-20.

8. Murayama A, Date T, Morikawa K, Akazawa D, Miyamoto M, Kaga M, Ishii K, Suzuki T, Kato T, Mizokami M, Wakita T. The NS3 helicase and NS5B-to-3'X regions are important for efficient

hepatitis C virus strain JFH-1 replication in Huh7 cells. *J Virol*. 2007 81(15):8030-40.

9. Hiraga N, Imamura M, Tsuge M, Noguchi C, Takahashi S, Iwao E, Fujimoto Y, Abe H, Maekawa T, Ochi H, Tateno C, Yoshizato K, Sakai A, Sakai Y, Honda M, Kaneko S, Wakita T, Chayama K. Infection of human hepatocyte chimeric mouse with genetically engineered hepatitis C virus and its susceptibility to interferon. *FEBS Lett*. 2007 581(10):1983-7.

10. D Akazawa, T Date, K Morikawa, A Murayama, M Miyamoto, M Kaga, H Barth, T F Baumert, J Dubuisson, T Wakita. CD81 Expression Is Important for Heterogeneous HCV Permissiveness of Huh7 Cell Clones. *J Virol*. 2007 81(10):5036-45.

11. Kato T, Matsumura T, Heller T, Saito S, Sapp RK, Murthy K, Wakita T, Liang TJ. Production of Infectious Hepatitis C Virus of Various Genotypes in Cell Culture. *J Virol*. 2007 81(9):4405-11.

12. K Morikawa, Z Zhao, T Date, M Miyamoto, A Murayama, D Akazawa, J Tanabe, S Sone, and T Wakita. The Roles of CD81 and glycosaminoglycans in the adsorption and uptake of infectious HCV particles. *J. Med. Virol* 2007 79(6):714-23.

13. E Larrea, JI Riezu-Boj, L Gil-Guerrero, N Casares, R Aldabe, P Sarobe, MP. Civeira, JL Heeney, T Wakita, F Borrás-Cuesta, JJ. Lasarte, J Prieto. Upregulation of indoleamine 2,3 dioxygenase in hepatitis C virus infection. *J Virol*. 2007. 81(7):3662-6.

14. Date T, Miyamoto M, Kato T, Morikawa K, Murayama A, Akazawa D, Tanabe J, Sone S,

- Mizokami M, Wakita T. An infectious and selectable full-length replicon system with hepatitis C virus JFH-1 strain. *Hepatology Research*, 2007 37(6):433-43
15. Shirakura M, Murakami K, Ichimura T, Suzuki R, Shimoji T, Fukuda K, Abe K, Sato S, Fukasawa M, Yamakawa Y, Nishijima M, Moriishi K, Matsuura Y, Wakita T, Suzuki T, Howley PM, Miyamura T, Shoji I. The E6AP ubiquitin ligase mediates ubiquitylation and degradation of hepatitis C virus core protein. *J Virol*. 2007 81(3):1174-85.
16. Kato T, Date T, Murayama A, Morikawa K, Akazawa D, Wakita T. Cell culture and infection system for hepatitis C virus. *Nature Protocols*, 2006 1(5): 2334-2339.
17. SL Uprichard, J Chung, FV Chisari, T Wakita. Replication of a hepatitis C virus replicon clone in mouse cells. *Virology Journal* 2006, 3:89
18. Shirato-Horikoshi H, Ogawa S, Wakita T, Takeda N, Hansman GS. Binding activity of norovirus and sapovirus to histo-blood group antigens. *Arch Virol*. 2007 152(3):457-61.
19. Wagoner J, Austin M, Green J, Imaizumi T, Casola A, Brasier A, Khabar, KS, Wakita T, Gale M Jr, Polyak SJ. Regulation of CXCL-8 (Interleukin 8) Induction by dsRNA Signaling Pathways During Hepatitis C Virus Infection. *J Virol*. 2006 81(1):309-18
20. E Blanchard, S Belouzard, L Goueslain, T Wakita, J Dubuisson, C Wychowski, Y Rouillé. Hepatitis C virus entry depends on Clathrin-Mediated Endocytosis. *J Virol*. 2006. 80(14):6964-72.
21. T Kanda, A Basu, R Steele, T Wakita, JS. Ryerse, R Ray, RB Ray. Generation of infectious hepatitis C virus in immortalized human hepatocytes. *J Virol*. 2006. 80(9):4633-9.
22. N Ishii, K Watashi, T Hishiki, K Goto, D Inoue, M Hijikata, T Wakita, N Kato, K Shimotohno. Characterization of the replication sensitivity to cyclosporin A among strains of hepatitis C virus. *J Virol*. 2006. 80(9):4510-20.
23. Kato T, Date T, Miyamoto M, Wakita T. A novel virus culture system for hepatitis C virus. *Future Virology*, 2006, 1: 519-525.
24. Kato T and Wakita T. Development of an Infectious HCV Cell Culture System. In: *Hepatitis C Viruses Genomes and Molecular Biology* (ed. by Tan, S-L.) Horizon Bioscience, 2006, pp451-464.
25. Y Rouillé, F Helle, D Delgrange, P Roingeard, C Voisset, E Blanchard, S Belouzard, J McKeating, A Patel, G Maertens, T Wakita, C Wychowski, J Dubuisson. Subcellular localization of hepatitis C virus structural proteins in a cell culture system that efficiently replicates the virus. *Journal of Virology*, 2006. 80. 2832-41.
26. Yi M, Villanueva RA, Thomas DL, Wakita T, Lemon SM. Production of infectious genotype 1a hepatitis C virus (Hutchinson strain) in cultured human hepatoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 103(7):2310-5, 2006.
27. M Miyamoto, T Kato, T Date, M Mizokami, T Wakita. Characterization of Genotype 2a Hepatitis C Virus Subgenomic Replicon in Comparison with Genotype 1b Replicon. *Intervirology*, 49:37-43, 2006.
28. T Kato, T Date, M Miyamoto, M Sugiyama, Y Tanaka, E Orito, T Ohno, K Sugihara, I

- Hasegawa, K Fujiwara, K Ito, A Ozasa, M Mizokami, T Wakita. Detection of Anti-Hepatitis C Virus Effects of Interferon and Ribavirin by a Sensitive Replicon System. *Journal of Clinical Microbiology* 2005, 43:5679-84
29. Cai Z, Zhang C, Chang K-Y, Jiang J, Ahn B-C, Wakita T, Liang, JT, Luo G. Robust production of infectious hepatitis C virus (HCV) from stably HCV cDNA-transfected human hepatoma cells. *Journal of Virology*. 79: 13963-13973, 2005.
30. J Zhong, P Gastaminza, G Cheng, S Kapadia, T Kato, DR Burton, SF Wieland, S Uprichard, T Wakita, FV Chisari. Robust Hepatitis C Virus Infection in Vitro. *PNAS* 2005, 102:9294-9299.
31. T Wakita, T Pietschmann, T Kato, T Date, M Miyamoto, Z Zhao, K Murthy, A Habermann, H-G Kräusslich, M Mizokami, R Bartenschlager, T J Liang. Production of Infectious Hepatitis C Virus in Tissue Culture from a Cloned Viral Genome. *Nat Med*. 2005 11:791-796.
32. Zhao Z, Date T, Li Y, Kato T, Miyamoto M, Yasui K, Wakita T. Characterisation of the E-138 (Glu/Lys) mutation in Japanese encephalitis virus using a stable full-length infectious cDNA clone. *J. Gen. Virol.* 2005, 86:2209-20.
33. 脇田隆字 ウイルス性肝炎 増刊号・ICP のためのウイルス学・臨床と微生物 2006, 33(10) 611-615
34. 相崎英樹、鈴木哲朗、脇田隆字 HCV増殖機構の解明 別冊・医学のあゆみ・消化器疾患 Ver.3 II. 肝・胆・膵 2006, 143-6
35. 脇田隆字 HCV発現細胞系の確立 別冊・医学のあゆみ・消化器疾患 Ver.3 II. 肝・胆・膵 2006, 147-51
36. 脇田隆字 JFH-1株を用いたC型肝炎ウイルス研究の進歩 医学のあゆみ 2006, 218(10) 883-888
37. 脇田隆字 C型肝炎ウイルス 分子細胞治療 2006 Vol.5, p364-367
38. 脇田隆字 HCVレプリコンシステム カレントセラピー、2006, 24(8), 67
39. 脇田隆字 培養細胞で効率よく複製するC型肝炎ウイルス株 *BIO Clinica*、2006, 21(4)366-371
40. 脇田隆字 HCVレプリコン 肝臓、2005, 46(12)691-702
41. 加藤孝宣、脇田隆字 C型肝炎ウイルス培養細胞感染系の確立 *ウイルス*、2005, 55(2)287-296
42. 脇田隆字 HCV粒子形成システム 肝疾患レビュー、2006, 119-23
43. 脇田隆字 感染性C型肝炎ウイルス粒子の培養細胞における作製 *医学のあゆみ*、2005, 215(11)920-1
44. 脇田隆字 宿主の新たな抗ウイルス活性によるB型肝炎ウイルス複製の抑制 *Hepatoday*、2005, (9)6-7
45. 脇田隆字 遺伝子型 2a のC型肝炎ウイルス (HCV) 由来の RNA レプリコン *バイオテクノロジージャーナル*、2005, 5(3)300-2
46. Murakami K., Inoue Y., Hmwe S., Omata K., Hongo T., Ishii K., Yoshizaki S., Aizaki H., Matsuura T., Shoji I., Miyamura T. and Suzuki T. Dynamic behavior of hepatitis C virus quasispecies in a long-term culture of the three-dimensional radial-flow bioreactor system. *Journal of Virological methods* 148: 174-181 (2008)
47. Yokota T., Iijima S., Kubodera T., Ishii K., Katakai Y., Ageyama N., Chen Y., Lee J.-J.,



- Nishina K., Maki N., Mizusawa H. and Akari H. Efficient regulation of viral replication by siRNA in a non-human primate surrogate model for hepatitis C. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 361: 294-300 (2007).
48. Mizutani T., Fukushi S., Kenri T., Sasaki Y., Ishii K., Endoh D., Zamoto A., Saijo M., Kurane I., and Morikawa S. Enhancement of cytotoxicity against Vero E6 cells persistently infected with SARS-CoV by *Mycoplasma fermentans*. *Archives of Virology* 152: 1019-1025 (2007).
49. Ishii K., Iijima S., Kimura N., Lee Y.-J., Ageyama N., Yagi S., Yamaguchi K., Maki N., Yoshizaki S., Machida S., Suzuki T., Iwata N., Sata T., Miyamura T. and Akari H. GBV-B as a pleiotropic virus: Distribution of GBV-B in extrahepatic tissues in vivo. *Microbes and Infection*, 9, 515-521 (2007).
50. Mizutani T., Fukushi S., Kenri T., Sasaki Y., Ishii K., Endoh D., Zamoto A., Saijo M., Kanaji H., Shirota K., Kurane I. And Morikawa S. Mechanisms of establishment of persistent SARS-CoV-infected cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 347: 261-5 (2006).
51. Mizutani T., Endoh D., Shirato K., Shimizu H., Fukushi S., Saijo M., Sakai K., Kwang L., Ito M., Nerome R., Takasaki T., Ishii K., Suzuki T., Kurane I., Morikawa S. and Nishimura H. System for rapid determination of viral RNA sequence by ligation-mediated amplification and direct sequencing technology for emerging viral infectious diseases. *Emerging Infectious Diseases*, 13: 322-324 (2007).
52. Nakai K., Kimura-Someya T., Okamoto T., Ishii K., Lim C.K., Tani H., Matsuo E., Abe T., Mori Y., Suzuki T., Miyamura T., Nunberg J.H., Moriishi K. and Matsuura Y. Oligomerization of hepatitis C virus core protein is crucial for interaction with cytoplasmic domain of E1 envelope protein. *Journal of Virology* 80: 11265-11273 (2006)
53. Matsuyama S., Ujike M., Ishii K., Fukushi S., Morikawa S., Tashiro M. and Taguchi F. Enhancement of SARS-CoV infection by proteases. *Adv. Exp. Med. Biol.* 581: 253-258 (2006)
54. Ishii K., Hasegawa H., Nagata N., Mizutani T., Morikawa S., Tashiro M., Suzuki T., Taguchi F., Takemori T., Miyamura T. and Tsunetsugu-Yokota Y. Highly attenuated vaccinia virus DIs as a potential SARS vaccine. *Adv. Exp. Med. Biol.* 581: 593-596 (2006)
55. Ishii K. Vaccines for severe acute respiratory syndrome. SARS, Mizutani T. ed.: 107-117, Transworld Research Network, Kerala, India (2006).
56. Murakami K., Ishii K., Ishihara Y., Yoshizaki S., Tanaka K., Gotoh Y., Aizaki H., Kohara M., Yoshioka H., Mori Y., Manabe N., Shoji I., Sata T., Bartenshalager R., Matsuura Y., Miyamura T. and Suzuki T. Production of infectious hepatitis C virus particles in three-dimensional cultures of the cell line carrying the genome-length dicistronic viral RNA of genotype 1b. *Virology* 351: 381-392 (2006).
57. Ishii K., Hasegawa H., Nagata N., Mizutani T., Morikawa S., Tashiro M., Suzuki T., Taguchi F., Takemori T., Tsunetsugu-Yokota Y. and Miyamura T. Induction of Protective Immunity

against Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus (SARS-CoV) Infection using Highly Attenuated Recombinant Vaccinia Virus DIs. *Virology* 351: 368-380 (2006).

58. Ohnishi K., Sakaguchi M., Kaji T., Akagawa K., Taniyama T., Kasai M., Tsunetsugu-Yokota Y., Ohshima M., Yamamoto K., Takasuka N., Hashimoto S., Ato M., Fujii H., Takahashi Y., Morikawa S., Ishii K., Sata T., Takagi H., Itamura S., Odagiri T., Miyamura T., Kurane I., Tashiro M., Kurata T., Yoshikura H. and Takemori T. Immunological detection of severe acute respiratory syndrome coronavirus by monoclonal antibodies. *Japanese Journal of Infectious Diseases*. 58: 88-94 (2005)

60. 石井孝司、李 天成、武田直和 E型肝炎 食品由来感染症と食品微生物 中央法規出版 印刷中 (2007)

61. 石井孝司、李 天成、武田直和 E型肝炎 感染・炎症・免疫 37: 58-59 (2007)

62. 李天成、石井孝司、武田直和 E型肝炎ウイルス：感染様式と食中毒 遺伝 印刷中

63. 石井孝司、水谷哲也 SARS コロナウイルス研究の最前線 医学のあゆみ 218: 839-844 (2006)

64. 石井孝司、李天成 肝炎ウイルス VLP の作成と応用 感染・炎症・免疫 36: 44-47 (2006)

## 2. 学会発表

1) 脇田隆宇、C型肝炎ウイルスの感染複製系の開発、第41回日本肝臓学会総会、パネルディスカッション「ウイルス肝炎治療戦略の今後の展望」、大阪国際会議場 (2005, 6.17)

2) 田邊陽子、坂本直哉、中川美奈、小山知行、

井津井康浩、武田嘉恵、関根裕子、田坂めぐみ、柿沼晴、陳正新、脇田隆宇、渡辺守、キメラレポーター遺伝子発現HCVレプリコンシステムを用いた多種細胞株でのウイルス増殖動態の解析、第41回日本肝臓学会総会、ワークショップ6「ウイルス性肝炎の最近の進歩」、大阪国際会議場 (2005, 6.17)

3) 田邊陽子、坂本直哉、中川美奈、小山知行、井津井康浩、関根裕子、柿沼晴、脇田隆宇、渡辺守、キメラレポーター遺伝子発現HCV repliconを用いたウイルス増殖動態の多種細胞株での検討、第9回日本肝臓学会大会、神戸 (2005, 10.5)

4) 森川賢一、趙子江、田邊純一、伊達朋子、宮本道子、村山麻子、脇田隆宇、C型肝炎ウイルス粒子のHuh7細胞への感染におけるheparin様分子の関与、第53回日本ウイルス学会学術集会、パシフィコ横浜 (2005, 11.20)

5) 田邊純一、森川賢一、伊達朋子、宮本道子、村山麻子、脇田隆宇、培養細胞から分泌されたC型肝炎ウイルス粒子の生化学的特徴化、第53回日本ウイルス学会学術集会、パシフィコ横浜 (2005, 11.20)

6) 脇田隆宇、「C型肝炎ウイルスの感染複製系の樹立とその応用」、第8回仙台Liver Meeting、仙台エクセルホテル東急、(2006, 6.24)

7) 脇田隆宇、「C型肝炎ウイルス培養系の構築とその応用」、第7回横浜青葉・緑消化器病研究会、青葉台フォーラム、(2006, 7.21)

8) 脇田隆宇、「C型肝炎ウイルスのウイルス培養系の構築とその応用」、第4回湯沢リバーシンポジウム、NASPA ニューオータニ、(2006, 9.9)

9) 脇田隆宇、「C型肝炎ウイルス培養系の開発とその展望」、第14回Schering-Plough Liver Forum (Tokyo)、赤坂プリンスホテル、(2006, 11.18)

- 10) 脇田隆宇, ランチョンセミナー「C型肝炎ウイルスの感染複製系の樹立とその応用」  
日本ウイルス学会第54回学術集会、名古屋国際会議場(2006, 11.19-21)
- 11) 脇田隆宇, 「C型肝炎ウイルスのウイルス培養系開発とその応用」、第10回東海ウイルス感染症研究会、安保ホール(名古屋市)、(2007, 1.13)
- 12) 脇田隆宇, 「C型肝炎ウイルスのウイルス培養系の開発とその応用」、第13回トガ・フラビ・ペスチウイルス研究会、笹川記念会館、(2007, 1.19)
- 13) 赤澤大輔、伊達朋子、森川賢一、村山麻子、加賀美奈子、脇田隆宇、「HCV感染に関する宿主因子の探索」、第2回広島大学肝臓プロジェクト研究センターシンポジウム、広島大学廣仁会館(2006, 6.18)
- 14) 森川賢一、脇田隆宇 C型肝炎ウイルス粒子の Huh7 細胞への感染における HSPG および CD81 の関与 第42回日本肝臓学会総会、国立京都国際会館(2006, 5.25-26) ワークショップ1「ウイルス性肝炎研究の最前線」
- 15) 脇田隆宇、相崎英樹、鈴木哲朗 C型肝炎ウイルスの感染増殖とそれに関する宿主因子の解析 第10回日本肝臓学会大会、札幌(2006, 10.11-12) シンポジウム6「ウイルス肝炎進展因子の解明」
- 16) 関根裕子、坂本直哉、中川美奈、田坂めぐみ、櫻井幸、井津井康浩、陳正新、榎本信幸、脇田隆宇、渡辺守、C型肝炎ウイルス感染増殖系を用いた薬剤のウイルス増殖抑制効果の検討、第42回日本肝臓学会総会、国立京都国際会館(2006, 5.25-26)
- 17) 棟方翼、脇田隆宇、野本明男、C型肝炎ウイルス(HCV)による自然免疫受容体 TLR3 の発現制御、日本ウイルス学会第54回学術集会、名古屋国際会議場(2006, 11.19-21)
- 18) 森田奈央子、野村知里、石橋真理子、楠美嘉晃、杉谷雅彦、脇田隆宇、高山忠利、江角真理子、類洞内皮C型レクチン L-SIGN とC型肝炎ウイルス、日本ウイルス学会第54回学術集会、名古屋国際会議場(2006, 11.19-21)
- 19) 赤澤大輔、伊達朋子、森川賢一、村山麻子、脇田隆宇、HCV感染に関する宿主因子の探索、日本ウイルス学会第54回学術集会、名古屋国際会議場(2006, 11.19-21)
- 20) 相崎英樹、原 弘道、井上 寧、松田麻未、松浦善治、宮村達男、脇田隆宇、マイケルライ、鈴木哲朗、HCV RNA 複製を調節する分子シャペロンの同定とその機能解析、日本ウイルス学会第54回学術集会、名古屋国際会議場(2006, 11.19-21)
- 21) 政木隆博、鈴木亮介、松田麻未、松浦善治、宮村達男、脇田隆宇、鈴木哲朗、RNA Polymerase I promoter/terminator 系を用いた感染性 HCV 粒子の作成、日本ウイルス学会第54回学術集会、名古屋国際会議場(2006, 11.19-21)
- 22) 石橋真理子、脇田隆宇、江角真理子、C型肝炎ウイルス量の多い肝臓で発現増強する遺伝子 OASL の機能解析、日本ウイルス学会第54回学術集会、名古屋国際会議場(2006, 11.19-21)
- 23) 村山麻子、伊達朋子、森川賢一、赤澤大輔、脇田隆宇、HCV JFH-1 株の RNA 複製に必要な領域の同定、日本ウイルス学会第54回学術集会、名古屋国際会議場(2006, 11.19-21)
- 24) 福田浩一郎、勝二郁夫、白倉雅之、村上恭子、下地徹、高橋由利絵、阿部克俊、奈須純一、鈴木哲朗、脇田隆宇、水本清久、宮村達男、E6AP 依存性 HCV core 蛋白分解の分子認識機構の解析、日本ウイルス学会第54回学術集会、名古屋国

際会議場(2006, 11.19-21)

25) 石井孝司、張斌、李津、白倉雅之、森川賢一、鈴木亮介、宮村達男、脇田隆宇、鈴木哲朗、HCV の subgenomic replicon を持つウイルス様粒子の形成と放出、日本ウイルス学会第54回学術集会、名古屋国際会議場(2006, 11.19-21)

26) 脇田隆宇、「C型肝炎のウイルス培養系の開発とその応用」、第43回肝形態科学研究会、ホテルグランパシフィックメリディアン、(2007, 5.30)

27) 脇田隆宇、「in vivoとin vitroにおけるHCV複製」、第4回ウイルス学キャンプin 湯河原、ウエルシティ湯河原、(2007, 6.6-7)

28) 脇田隆宇、「C型肝炎ウイルスの基礎研究」、第3回広島肝臓プロジェクト研究センターシンポジウム、広島大学廣仁会館、(2007, 6.29)

29) 脇田隆宇、「C型肝炎ウイルスの感染増殖機構」、The 6th Hepatitis Expert Meeting、軽井沢プリンスホテル、(2007, 8.25)

30) 脇田隆宇、「C型肝炎ウイルスの複製および増殖機構」、第27回名古屋肝炎セミナー 第116回名古屋肝炎研究会、名古屋東急ホテル、(2007, 9.21)

31) 脇田隆宇、「Infection and replication of hepatitis C virus」、アジア太平洋消化器病週間 Asian Pacific Digestive Week 2007サテライトシンポジウム、神戸商工会議所会館、(2007, 10.17)

32) 脇田隆宇、「基礎研究に基づくC型肝炎ウイルスの新規治療とワクチン開発」、第10回熊本ウイルス感染症研究会、熊本全日空ホテル、(2007, 10.26)

33) 脇田隆宇、「C型肝炎ウイルスの基礎研究」、第22回臨床肝臓カンファレンス、日本海運倶楽部、(2007, 11.10)

34) 脇田隆宇、「C型肝炎ウイルス基礎研究の

進歩」、第167回高知肝疾患症例検討会、高知新阪急ホテル、(2007, 11.20)

35) 脇田隆宇、「C型肝炎ウイルスの複製および粒子形成」、学術講演会第10回 リサーチフォーラム「ウイルスとヒト」、芝蘭会館別館、(2007, 12.22)

36) 脇田隆宇、「C型肝炎ウイルスに対するワクチン開発」第11回日本ワクチン学会学術集会、パシフィック横浜、(2007, 12.8-9)

37) 今村道雄、平賀伸彦、木村俊之、畠山剛、柘植雅貴、野口千笑、高橋祥一、本多政夫、金子周一、脇田隆宇、茶山一彰、培養細胞および動物モデルを用いた肝炎ウイルスのインターフェロン感受性の検討、第43回日本肝臓学会総会、ホテルグランパシフィックメリディアン、(2007, 5.31-6.1)、ワークショップ1「肝炎ウイルス研究の進歩」

38) 相崎英樹、原弘道、森川賢一、宮村達男、脇田隆宇、鈴木哲朗、脂質のC型肝炎ウイルス感染、粒子形成における役割、第43回日本肝臓学会総会、ホテルグランパシフィックメリディアン、(2007, 5.31-6.1)、ワークショップ1「肝炎ウイルス研究の進歩」

39) 森川賢一、脇田隆宇、培養細胞で作製した感染性C型肝炎ウイルス(HCV)粒子のワクチン開発への応用、第43回日本肝臓学会総会、ホテルグランパシフィックメリディアン、(2007, 5.31-6.1)、ワークショップ1「肝炎ウイルス研究の進歩」

40) 脇田隆宇、C型肝炎ウイルスの感染および複製増殖機構、第31回阿蘇シンポジウム「ウイルスと戦う」、阿蘇プリンスホテル、(2007, 7.27-28)

41) 有海康雄、黒木美沙緒、阿部健一、團迫浩方、池田正徳、脇田隆宇、トロノ ディディエ、加藤宣之、DNA 損傷センサーATM と Chk2 は HCV