

200931014B

厚生労働科学研究費補助金

新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業

中空粒子を用いたウイルス性肝炎の  
新しい検査・予防法の開発

平成19～21年度 総合研究報告書

研究代表者 武田 直和  
鈴木 哲朗

平成22(2010)年 3月

厚生労働科学研究費補助金

新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業

中空粒子を用いたウイルス性肝炎の  
新しい検査・予防法の開発

平成19～21年度 総合研究報告書

研究代表者 武田 直和  
鈴木 哲朗

平成22（2010）年 3月

## 目 次

### I. 総括研究報告

|                                    |   |
|------------------------------------|---|
| 中空粒子を用いたウイルス性肝炎の新しい検査・予防法の開発 ..... | 3 |
| 鈴木 哲朗                              |   |

|                          |    |
|--------------------------|----|
| II. 研究成果の刊行に関する一覧表 ..... | 27 |
|--------------------------|----|

|                        |    |
|------------------------|----|
| III. 研究成果の刊行物・別冊 ..... | 37 |
|------------------------|----|

# I . 総合研究報告

## 中空粒子を用いたウイルス性肝炎の新しい検査・予防法の開発

研究代表者（19, 20 年度）武田 直和 国立感染症研究所 ウイルス第二部 室長  
（21 年度）鈴木 哲朗 国立感染症研究所 ウイルス第二部 室長

研究要旨 ウイルス様粒子（virus-like particles, VLP）をウイルス抗原として大量調製し、ワクチン開発または診断検査法への応用を目指し以下の成果を得た。

- 1) ノトバイオトプタ感染モデルで、ウイルスの経口接種では日齢の違いにより HEV に対する感受性が異なることを見出した。
- 2) 同モデルにおいて、VLP が高い免疫原性を有することを確認し、単回経鼻投与によりワクチン効果が期待できることを明らかにした。
- 3) E 型肝炎ウイルス（HEV）が感染増殖する培養細胞系を確立した。
- 4) ネイティブ粒子と同一サイズの HEV-LP 作製に成功した。小型 VLP では認められなかった HEV 遺伝子パッケージングが観察された。
- 5) 野生イノシシを対象とした、紀伊半島から大阪府南部における HEV の疫学調査から HEV 保有状況には地域的偏りが存在することが推測された。
- 6) VLP を免疫原としてモノクローナル抗体を作製し、genotype 1 及び 3 に交叉反応する抗体を取得した。
- 7) C 型肝炎ウイルス（HCV）の subgenomic replicon を保持する細胞に HCV の構造蛋白を trans に供給することにより、感染性の HCV-LPs を形成させることに成功した。
- 8) HCV J6/JFH1 株の継代培養により従来より感染価の高いウイルス産生細胞を樹立することを試み、従来より 10-100 倍感染価の高いウイルス産生系の樹立に成功した。
- 9) HCV J6/JFH-1 感染系を用いて C 型肝炎患者血清中の中和抗体を測定する系を樹立した。
- 10) B 型肝炎ウイルス（HBV）粒子の分泌を制御する配列が preS1-preS2 領域にも存在する可能性を示し、preS1 領域から発現させることにより、各遺伝子型の S 抗原を効率良く分泌させることができることが示された。
- 11) メルケル細胞ポリオーマウイルス（MCV）の VLP 作製と精製に成功し、これを使った抗 MCV 抗体測定系を開発し我が国健常者における同抗体保有率を明らかにした。

分担研究者

田中 智之 堺市衛生研究所 所長

恒光 裕 動物衛生研究所 研究チーム長

勝二 郁夫 神戸大学医学研究科 准教授

石井 孝司 国立感染症研究所 室長

李 天成 国立感染症研究所 主任研究官

鈴木 哲朗（20 年度）

## A. 研究目的

本研究は、ウイルス様粒子 (virus-like particles, VLP) をウイルス抗原として大量調製し、ワクチン開発または診断検査法への応用を目指す。

中空の VLP はその内部に核酸を持たないことから、外来性遺伝子を取り込ませることが可能である。抗原抗体診断系への利用だけでなく、組織特異的な遺伝子治療用ベクター、あるいは多価ワクチンとしての可能性も秘めており、医療・福祉への貢献度も極めて高い。VLP が大量に産生できれば、ワクチン開発と診断試薬の性能向上の両面において格段の進展が期待でき、肝炎ウイルス感染症の予防と制圧に直接かわることが期待できる。

HEV については、VLP ワクチン開発へ向け感染動物モデル系で感染防御効果を評価する。また、ネイティブ粒子に近似した VLP を作り構造解析を行う。HEV-LP を抗原とする迅速、高感度抗体検出系、および特異抗体を用いた抗原検出系の作製を目指す。野生動物における感染実態を把握する。HCV については、粒子産生の効率上昇、VLP 作製技術の確立などを行う。HBV については、粒子分泌効率の向上を図る。

## B. 研究方法

### 1. HEV

#### 1-1. 培養細胞系での感染増殖

HEV 感染ブタの肝臓組織をすりつぶし、PBS (-) で 10% 乳剤を作製した。ELISA 法および RT-PCR 法によってウイルス抗原と遺伝子を確認した。1 ml の肝細胞乳剤をそれぞれ PLC/PRF/5、A549 および GL37 細胞に接種し、培養上清を二、三日置きに採取した。細胞培養上清のウイルス抗原、およびウイルス遺伝子を測定し、培養細胞で増殖するかどうかを評価した。HEV 感染は確認された PLC/PRF5 細胞を大量培養し、超遠心法により培養上清中のウイル

ス粒子を濃縮した。さらに、濃縮ウイルスをシヨ糖密度勾配遠心にかけて、各フラクションを回収し、抗原および HEV-RNA をウェスタンブロット法とリアルタイム RT-PCR 法で測定した。ウイルス抗原と遺伝子両方とも検出したフラクションを電子顕微鏡でウイルスの形態を観察した。培養系で産生された HEV の感染性を調べるため感染細胞の培養上清をカニクイザルに接種し便中および血中の HEV 遺伝子、抗原および抗体を測定した。

#### 1-2. VLP の作製

HEV ORF2 の全長、および部分欠損または置換変異体の組換えバキュロウイルスを作製した。昆虫細胞 Sf9 に MOI:10 で感染後、感染細胞と培養上清から構造蛋白分画を回収し、シヨ糖密度勾配遠心法、塩化セシウム平衡密度勾配遠心法で精製した。免疫電子顕微鏡法により粒子形態を観察した。

#### 1-3. 感染防御実験

豚における HEV の日齢感受性を比較検討するため、3 日齢と 30 日齢のノトパイオート豚を用いて HEV の実験感染を行った。感染防御を示す VLP の最小有効量の検討は、ノトパイオート豚に種々の濃度の VLP を 1 週間隔で 3 回経鼻あるいは経口投与後に HEV で攻撃して実施した。また、VLP の少回数投与による感染防御効果の検討は、0.5 mg/dose の VLP を 1 回あるいは 2 回、経鼻あるいは経口投与後に HEV で攻撃して実施した。血清中ならびに糞便中の HEV RNA は nested RT-PCR 法あるいはリアルタイム PCR 法で、HEV 抗体は ELISA 法で検査した。

#### 1-4. 野生動物における HEV 保有動向調査

大阪府南部に定点地区を設け野生イノシシの肝臓、血清を採取した。猟師からはインフォ

ームドコンセントのもとに採血し HEV 抗体測定を行った。nested RT-PCR により HEV 遺伝子の検出を行った。また、血清中の HEV IgG 抗体を ELISA 法で測定した。

交雑種と野生イノシシの識別は、Haplotypes、すなわち mitochondrial DNA (mtDNA) の検索、また、Genotypes すなわち nuclear glucosephosphate isomerase-processed pseudogene (*GPIP*) の検索によった。

## 2. HCV

### 2-1. プラスミドトランスフェクションによる HCV-LP の作製

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：pEF4 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。

粒子中に HCV replicon を保持する HCV-LP の形成：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。

HCV-LPs の感染性の確認：上記の方法で精製した 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。

HCV replicon への外来遺伝子導入の検討：HCV replicon のレポーター遺伝子を luciferase と neomycin 耐性遺伝子の融合蛋白、あるいは green fluorescent protein (GFP) と

neomycin 耐性遺伝子の融合蛋白に置換し、本レプリコンを保持する細胞株を作成した。上記と同様の方法で HCV 構造蛋白を発現するプラスミドを導入し、HCV-LPs を恒常的に分泌する細胞株を取得した。これらの細胞株から分泌される HCV-LPs を精製し、感染させた細胞で luciferase や GFP が発現されるかを調べた。

2 種類のプラスミドトランスフェクションによる HCV-LPs の形成：JFH-1 株の core から NS2 領域の cDNA を pCAGGS に組み込んだ pCAG C-NS2 および、E2、p7、NS2 にそれぞれ変異 (N417S、N765D、Q1012R) を導入した pCAG C-NS2 mut を作製した。また JFH-1 株のレプリコン (構造蛋白領域を欠損し、EMCV-IRES および F-luc 遺伝子を挿入したもの) cDNA を polI promoter/terminator 間に挿入し、pHH JFH1 SGR-Fluc を作製した。これらのプラスミドを Huh-7 細胞へトランスフェクションし、その培養上清をさらに naive な Huh-7 細胞に感染させ、3 日後の細胞のルシフェラーゼ活性を測定する事により、上清中の感染価を評価した。

3 種類のプラスミドトランスフェクションによる HCV-LPs の形成と NS2 領域の感染性への関与の検討：これまでの解析により、HCV-LP の感染性には NS2 領域の発現が必須であることが示されている。上記の構造領域発現プラスミドを core から p7 領域までと NS2 領域に分割し、それぞれを pCAGGS に組み込んだプラスミド (pCAGC-p7 および pCAGNS2) を作成した。この 2 種類のプラスミドと pHH JFH1 SGR-Fluc を Huh-7 細胞に導入し、同様に上清中の感染価を測定した。NS2 の感染性への関与を調べるため、pCAGNS2 の NS2 領域に欠失変異や点変異を導入した種々のプラスミドを作成した。pCAGC-p7 および pHH JFH1 SGR-Fluc と共に naive な Huh-7 へプラスミドトランスフェクションを行い、上清中の感染価を測定した。HCV JFH-1 株の core から NS2 領域の cDNA を pCAGGS に組み込んだ

pCAG C-NS2 および、E2、p7、NS2 にそれぞれ変異 (N417S、N765D、Q1012R) を導入した pCAG C-NS2 mut を作製した。また JFH-1 株のサブゲノムレプリコン cDNA を polI promoter/terminator 間に挿入し、pHH JFH1 SGR-Fluc を作製した。これらのプラスミドを Huh-7 細胞へトランスフェクションし、その培養上清をさらに naïve な Huh-7 細胞に感染させ、3 日後の細胞のルシフェラーゼ活性を測定する事により、上清中の感染価を評価した。

## 2-2. 適応変異を有する組換え HCV の作製と機能解析

HCV J6/JFH 株を用いて in vitro でウイルス RNA を合成し、Huh-7.5 細胞株へエレクトロポレーション法で RNA を細胞内へ導入した。この HCV 感染細胞を 3-4 日ごとに継代し、上清中のウイルス感染価を測定した。

継代により上清中の感染価が増大したものについてダイレクトシーケンシング法で遺伝子解析を行い、どの領域に変異が入っているか検討した。ウイルス感染価に影響をおよぼす適応変異を解析した。

適応変異 HCV ウイルス株にあるアミノ酸変異を基に QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit で HCV RNA 作製用のプラスミドを構築した。さらに適応変異株が有する E2 の 4 アミノ酸変異をもつプラスミド (E2) と、各々一つ含むプラスミド (T396A、N416A、N534H、A712V) も作製した。

HCV RNA transfection とウイルス粒子産生：上記で作製したプラスミドを XbaI で消化し直鎖状にした後、T7 RiboMax Express Large Scale RNA Production System で RNA を合成し、Huh-7.5 細胞にエレクトロポレーションで導入した。その後、細胞培養し、経時的に上清中の HCV 感染性粒子を採取した。

HCV コア蛋白量の測定：オーソ HCV 抗原 ELISA

テストを用いて細胞内、又は上清中の HCV コア蛋白量を測定した。

HCV 感染力価の測定：HCV 感染 24 時間後に、HCV 抗原陽性細胞を抗 HCV 血清で免疫蛍光染色し、感染力価 (ffu/ml) を測定した。

CD81 阻害：anti-CD81 antibody 又は対照 IgG で一時間前処理しておいた Huh 7.5 細胞に、組換えウイルスをそれぞれ moi 0.01 で感染させ、感染 24 時間後に感染力価を測定した。

## 2-3. フォーカス形成阻害アッセイ：HCV

J6/JFH1 株を用いて focus reduction neutralization assay を行い、血清中の focus 形成阻止活性を測定し、中和抗体価を算出した。

## 3. HBV

### 3-1. HBs 抗原分泌機構の解析

様々な遺伝子型の HBV クローン (名古屋市立大学/国立国際医療センターの溝上雅史先生から供与) を Huh-7 細胞へトランスフェクトした後、上清中の HBs 抗原および細胞内での HBV 複製を ELISA で測定した。そして、上清への HBs 抗原分泌効率を比較した。

細胞上清中への HBs 抗原分泌効率が高いクローンを選択し、Huh-7 細胞で恒常的に発現する細胞株を樹立した。

HBV キメラプラスミドの作製：HBV-Aeus, HBV-Cat 株の PreS1, PreS2, S 領域をそれぞれ組換えた AAA, CAA, CCA, ACA, CCC, ACC, AAC, CAC 型を PCR 法で作製し、pSV プラスミドにサブクローニングした。

Huh-7 細胞へトランスフェクトした後、上清中の HBs 抗原および細胞内での HBs 抗原の発現をウエスタンブロット法で確認した。

細胞上清中への HBs 抗原分泌効率を ELISA 法で検討し、どの領域が重要であるか解析する。

## 4. MCV



MCV 遺伝子は感染研感染病理部 片野先生より分与された。VP1 遺伝子 (423 アミノ酸長) を組み込んだバキュロウイルストランスファクターを作製、昆虫細胞 SF9 にトランスフェクションし、相同組み換えにより組み換えバキュロウイルスを取得した。組み換えウイルスを Tn5 細胞へ感染させ、7 日後の培養上清を集め、塩化セシウム平衡遠心により VLP 分画を分離、精製した。

精製した VLP を抗原とした抗体 ELISA を確立し、健常人における MCV 感染状況を調査した。健常人血清は感染研血清銀行より供与された。

#### (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。本研究でヒト由来血清を使用する場合、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。

動物実験に関しては「動物の保護及び管理に関する法律」(昭和 48 年法律第 105 号) 及び「実験動物の飼養及び保管に関する基準」(昭和 55 年総理府公示第 6 号) の法律及び基準の他、「大学等における実験動物について」(文部科学省国際学術局長通知、文学情第 141 号) の通知を踏まえつつ、動物実験が有効かつ適切に行われるよう配慮した。当該研究機関の動物実験倫理委員会に申請し承認を受けた後実施した。

### C. 研究結果

#### 1. HEV

##### 1-1. 感染増殖細胞系の確立

G3 HEV を感染させた PLC/PRF/5 細胞の上清

に 5 日目から HEV-RNA が検出され、32 日目から HEV 構造蛋白が検出された。その後、HEV 構造蛋白および HEV-RNA はコンスタントに培養上清から検出され、感染後 10 ヶ月が経った時点でも依然高い HEV 産生レベルを維持している。免疫蛍光抗体法により感染細胞を解析したところ、HEV 構造蛋白が細胞質に分布していることが示された。さらに構造蛋白をウェスタンブロット法で解析した結果、糖鎖修飾されることも示唆された。糖鎖修飾の意義、およびそのメカニズムをさらに解析する必要がある。

HEV 感染細胞の培養上清を回収しショ糖密度勾配遠心法により HEV 粒子を精製した。電顕観察により直径約 35 nm のウイルス粒子が認められた。さらにこのフラクションのショ糖を除去し、カニクイザルに静脈注射したところ、一週間後、カニクイザルの糞便から HEV RNA が検出され、その後、血中から抗 HEV 抗体も検出された。この結果から、培養細胞で増殖した HEV は感染性を有していることが示された。

##### 1-2. ネイティブ様粒子の作製と性状解析

種々の G3 由来株について ORF2 発現組換えバキュロウイルスを作製、昆虫細胞 Tn5 に感染させ、感染細胞内および培養上清に分泌された抗原量や粒子の形成を比較した。ネイティブ様粒子形成の効率は株間で違いが認められた。ネイティブ様粒子を形成しない T 株の 39 番目のセリンをグリシンに置換することにより、S 株と同様大きな粒子の形成が可能となった。また、S 株のグリシンをセリンへ置換することによって大きな粒子の形成ができなくなった。この結果、39 番目のアミノ酸はネイティブ様 HEV-LP の形成に重要な役割を果たしていることが示唆された。

##### 1-3. HEV-LP による感染防御効果

HEV の経口接種において、30 日齢のノト

バイオト豚は3日齢に比べて糞便ならびに血清中の HEV RNA の検出期間は短く、検出量も少なかった(図1)。一方、HEV の静脈内接種では、3日齢と30日齢の豚間でウイルスの検出期間や検出量に大きな違いは認められなかった。これらのことから、豚での HEV の経口感染において日齢により感受性が異なることが明らかとなった。血清中の HEV IgG 抗体の推移において、30日齢で HEV を接種した豚は3日齢の豚(経口接種ならびに経鼻接種)に比べて IgG 抗体の検出される時期が早い傾向にあった。次に、VLP の経鼻投与ならびに経口投与により液性免疫応答ならびに感染防御効果が認められた(図2、図3)。VLP による感染防御効果は濃度依存的であり、VLP を1週間隔で3回投与した時の最小有効量は経鼻投与ならびに経口投与どちらも 0.5 mg/dose であった。さらに、VLP 0.5 mg/dose を1回経鼻投与した豚においても感染防御効果が認められた(図4、表1)。これらのことから、VLP は豚において経粘膜投与により高い免疫原性ならびに感染防御効果が得られることが明らかとなった。

#### 1-4. 野生動物における HEV 保有状況解析

3年間で捕獲された62頭の野生イノシシのうち3頭(5%)から HEV 遺伝子が検出され、14頭(23%)から HEV 抗体が検出された(表2)。塩基配列の結果、従来の報告と同様に HEV G3 に分類された。相同性は98%以上の近縁なウイルスであった。

イノブタおよびイノシシの遺伝子学的識別のため用いられた野生イノシシの肝臓から抽出された mtDNA はニホンイノシシ遺伝子で、2種類検出された。日本に広く分布している型 J10 と J10 の 572bp 中で1箇所塩基置換がみられた遺伝子型であった。後者は和歌山県北部か

ら大阪府南部にかけて分布している地方集団と推察されている。一方、核 GPIP 遺伝子型に関しては、GPIP1 と GPIP3a の対立遺伝子が検出されたが、総べてホモであった。この対立遺伝子はニホンイノシシに多く検出されるもので、家畜ブタ(ヨーロッパ系)の対立遺伝子である GPIP4 や GPIP4a は今回のイノシシサンプルからは検出されなかった。つまり、近隣の家畜ブタとの交雑種を決定する遺伝子は検出されなかった。

紀伊半島北部の野生イノシシには mtDNA の変異が示唆されたが、HEV を保有する個体の特徴的な変異であるか否かについての結論には至らなかった。また、従来の研究成果に加えて野生イノシシには新たな5つの異なった haplotypes が見つかった。

#### 1-5. HEV モノクローナル抗体作製

HEV-VLP 免疫マウスから、2クローンのモノクローナル抗体が得られた。2クローンとも G1、G3 の VLP と同程度の反応性を示し、両遺伝子型間を交差反応する抗体と考えられた。

#### 2. HCV

##### 2-1. 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てい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。

##### 2-2. 粒子中に HCV replicon を保持する HCV-LP の形成

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、ショ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。HCV のエンベロープ蛋白の 1 つである E2 はヘパリンと結合する性質があることが知られているが、上記の構造蛋白と RNA が共存するフラクションをヘパリンアフィニティカラムにかけたところ、構造蛋白と RNA の大部分はヘパリンカラムに結合した。このことから、分泌された構造蛋白は RNA と共に何らかの構造体を形成していることが示唆された。

### 2-3. HCV replicon への外来遺伝子導入の検討

HCV replicon のレポーター遺伝子を luciferase と neomycin 耐性遺伝子の融合蛋白、あるいは GFP と neomycin 耐性遺伝子の融合蛋白に置換し、本 replicon を保持する細胞株を作成し、さらに HCV の構造蛋白を恒常的に発現するプラスミドを導入して HCV-LP を恒常的に分泌する細胞株を取得した。HCV-LP を感染させた細胞で luciferase や GFP が発現されるかを調べたところ、感染細胞でいずれのレポーター遺伝子も発現が確認され、replicon に導入した外来遺伝子は HCV-LPs の感染にともなって細胞内へ導入されることが確認できた。

### 2-4. 2種類のプラスミドトランスフェクションによる HCV-LPs の形成

HCV の発現プラスミドおよびレプリコンプラスミドを同時に Huh-7 細胞にトランスフェクションした細胞の上清を経時的に回収し、これをさらに naïve な Huh-7 細胞に感染させ、3 日後にルシフェラーゼ活性を測定したところ、陰性コントロール群(構造蛋白質発現プラスミドがない場合、およびレプリコンの RNA ポリメラーゼ活性を持たない変異体)に比べ、顕著に

高い活性が認められた。このことから、2つのプラスミドのトランスフェクションにより、HCV のレプリコンゲノムが packaging された感染性粒子が産生されたものと考えられた。また変異型構造蛋白質発現プラスミドを用いた群では、野生型に比べ、より高いルシフェラーゼ活性が認められた事から、これらの変異は感染性粒子の産生効率の向上に寄与するものと考えられた。さらにこの感染は HCV と同様に抗 CD81 抗体により阻害された事から、この粒子の感染様式は HCV と同様のメカニズムによる事が示唆された。

### 2-5. 3種類のプラスミドトランスフェクションによる HCV-LPs の形成と NS2 領域の感染性への関与の検討

構造領域を発現するプラスミドを core から p7 までと NS2 に分割することにより、NS2 への変異導入による機能解析が簡便に行えるものと考えられる。トランスフェクションした細胞の上清を経時的に回収し、これをさらに naïve な Huh-7 細胞に感染させ、3 日後にルシフェラーゼ活性を測定したところ、陰性コントロール群と比べ顕著に高い活性が認められた。3つのプラスミドのトランスフェクションによっても HCV のレプリコンゲノムが packaging された感染性粒子が産生できることが示された。

この方法を用いて NS2 領域に変異を導入した場合の感染性 HCV-LPs の形成についての検討を行った。NS2 のプロテアーゼ活性中心や、リン酸化部位と推定されるセリン残基をアラニンに置換した変異体は粒子形成能に影響しなかったが、NS2 の N 末端側の膜貫通領域や C 末端のアミノ酸を欠損させると、感染性粒子の産生は認められなかった。

HCV core-NS2 発現プラスミド及びレプリコンプラスミドを同時にトランスフェクションすることにより、HCV のレプリコンゲノムが

packaging された感染性粒子が産生されることを見出した。また適応変異となりうる変異を導入した構造蛋白質発現プラスミドを用いた群では、野生型に比べ、より高いレポーター活性が認められた事から、これらの変異は感染性粒子の産生効率の向上に寄与するものと考えられた。さらにこの感染は HCV と同様に抗 CD81 抗体により阻害された事から、この粒子の感染様式は HCV と同様のメカニズムによる事が示唆された。

構造領域を発現するプラスミドを core から p7 までと NS2 に分割することにより、NS2 への変異導入による機能解析が簡便に行えるものと考えられる。この方法を用いて NS2 領域に変異を導入した場合の感染性 HCV-LPs の形成についての検討を行った。NS2 のプロテアーゼ活性中心や、リン酸化部位と推定されるセリン残基をアラニンに置換した変異体は粒子形成能に影響しなかったが、NS2 の N 末端側の膜貫通領域や C 末端のアミノ酸を欠損させると、感染性粒子の産生は認められなかった。

## 2-6. 適応変異を有する組換え HCV の作製と機能解析

組換え HCV 感染力価の測定：各組換え HCV を  $\text{moi}=0.01$  で感染させ、上清中の maximal infectivity titer を比較した。増殖適応変異株は野生型に比し 5-10 倍高い感染力価を示した。しかし、アミノ酸変異を一つずつ含むウイルス株 (T396A、N416A、N534H、A712V) や E2 に 4 つアミノ酸変異をもつウイルス株 (E2) では感染力価の上昇は認められなかった。

HCV RNA エレクトロポレーション後のコア蛋白質量測定：適応変異株と野生型から *in vitro* RNA 合成し、Huh7.5 細胞にエレクトロポレーションした後、その細胞と上清を 4h、12h、24h、48h、72h 後にそれぞれ回収。それらの HCV コア蛋白質量を ELISA 法で比較したが、適応変異株

と野生型において、細胞内及び上清中のコア蛋白質量に顕著な差は認められなかった。

HCV 感染細胞のコア蛋白質量の測定：Huh7.5 に組換えウイルスを感染させ、感染後 day1, 3, 5 の細胞と上清を回収後、それらの HCV コア蛋白質量を ELISA 法を用いて測定した。適応変異株は野生型に比べ、感染後の細胞内のコア蛋白質量が約 10 倍高く、上清中のコア蛋白質量は約 5 倍高いことを確認した。

CD81 阻害実験：anti-CD81 antibody によって各ウイルスのエントリーは阻害された。10  $\mu\text{g/ml}$  の anti-CD81 antibody を用いて前処理した際、野生型、T396A、N416A、A712V は約 70% 感染力価が減少したが、適応変異株、E2、N534H では約 30% の感染力価の減少にとどまった。

## 2-7. HCV J6/JFH1 株による中和抗体測定系の樹立

HCV J6/JFH1 株を用いて focus reduction neutralization assay を行い、中和抗体価を算出が可能であることを示した。EVR、SVR の患者では non-EVR、non-SVR の患者に比し、中和抗体価が有意に高かった。

## 3. HBV

### 3-1. HBs 抗原分泌機構の解析

HBV genotype A, B, C の各クローンを Huh-7 細胞にトランスフェクトして、上清中への HBs 抗原を測定した。genotype A (HBVAe) は genotype C (HBV CA) と比較して遺伝子複製の効率は高くないにもかかわらず、上清中に分泌する効率が低いことが再現良く示された。pUCHBV-Ae と pZeoSV2 を Huh-7 細胞に co-transfect し、Zeocin で選択することにより HBV-Ae を恒常的に発現する Huh-7 細胞株の樹立に成功した。この中から HBs 抗原の分泌効率の高いクローンを選別した。ショ糖密度勾配遠心法で HBs 抗原の分離調整法を解析した。

1. 10-1. 15g/ml 付近に効率よく HBs 抗原粒子が回収された。

HBV キメラプラスミドの作製：HBV-Aeus, HBV-Cat 株の PreS1, PreS2, S 領域をそれぞれ組換えた AAA, CAA, CCA, ACA, CCC, ACC, AAC, CAC 型を作製した。HBsAg の上清中への分泌量は genotype A の方が genotype C より高かった。genotype A と C で S 領域の分泌に関与するアミノ酸は保存されていた。使用した genotype A と C の HBV プラスミドで配列を比較したところ、S はアミノ酸レベルで 92.9% homology で 10 個、PreS1 は 91.6% homology で 11 個、PreS2 は 80% homology で 15 個の差が存在した。PreS1 は 91.6% homology で 29 ヌクレオチド、PreS2 は 85.5% homology で 24 ヌクレオチド、S は 94.4% homology で 37 ヌクレオチドの差があった。preS1-preS2 を genotype A 型に置換したところ、genotype C の S 抗原分泌が亢進した。逆に preS1-preS2 を genotype C 型に置換したところ、genotype A の S 抗原分泌が減少した。

#### 4. MCV

##### 4-1. MCV の VLP 作製及び抗 MCV 抗体検査法の確立

新規ヒトポリオマウイルス MCV は近縁ウイルスとの相同性から VP1 遺伝子がウイルス構造蛋白をコードすると推定される。5.4 kb ゲノムから VP1 領域 (1.2 kb) をバキュロウイルストランスファーベクターへサブクローン化し、常法に従って組み換えバキュロウイルスを作製した。組み換えウイルス感染 Tn5 細胞では細胞に約 48 kDa の全長 VP1 蛋白が主に検出されたが、培養上清中からは 42-45 kDa 程度のバンド数本認められた。VPI 発現後に N 末端または C 末端側が切断され細胞外へ分泌される可能性が考えられた。感染後 7 日目の培養上清を集め 10,000xg, 1 時間遠心の上清を 100,000xg, 3 時間遠心でペレット化した。可

溶化し塩化セシウム平衡遠心 (35,000 rpm, 36 時間) に供した。20 分画に分け VP1 蛋白検出を行ったところ、1.29-1.32 g/mL の各分画に認められ、電子顕微鏡観察によってこれらの分画から直径約 50 nm の球形粒子構造が観察された。一部の分画では、50 nm 粒子に加え約 20 nm の小さい粒子構造も認められた。

精製 VLP をラットに接種し抗 MCV 抗血清を作製し、抗原性をヒトポリオマウイルス BKV、JCV と比較した結果、MCV 抗体は BKV、JCV と交差反応しないことが示された。この VLP を用いて MCV 抗体検出 ELISA を開発し我が国の健常人における抗体保有率を解析した。男女ともに若年層では加齢とともに保有率は上昇し 1-70 歳の保有率は 43%であった。男女差、地域差は認められなかった。各世代の MCV 抗体保有率は BKV に比べ低い傾向であった。

#### D. 考察

##### 1. HEV

HEV が増殖できる培養細胞系を確立した。培養細胞の樹立によって、ウイルス増殖、複製のメカニズムの解明に新たな道が開かれる。又、これによって HEV の不活化条件、消毒薬の評価、ワクチン効果、さらに治療薬のスクリーニング等を *in vitro* で容易に検討することが可能になり、食品等からのウイルス除去に有力な科学根拠を提供できる。さらに、培養細胞の樹立によって生 E 型肝炎ワクチンあるいは不活化 E 型肝炎ワクチンの開発も可能となる。

本研究で HEV の細胞培養系を樹立したが、その産生レベルは低く、ウイルス構造解析、診断法開発に利用することは依然として困難である。今回、得られたネイティブ様 VLP は構造解析等に極めて有用と考えられる。また、これまでの小型 VLP には HEV 遺伝子を取り込まれていなかったが、今回の VLP 内部には HEV 配列が取り込まれていることを見出した。このことから、

本ネイティブ様 VLP を利用することにより、HEV のゲノムパッケージングなどウイルス複製機構の研究が進展するものと期待される。

本研究により、豚での HEV の経口接種において日齢の違いにより HEV の感染性が異なることが示された。これまでの豚を用いた HEV の実験感染に関する報告において、経口接種では感染成立は困難であった。その原因として供試された豚の日齢が高いことが今回の成績から推測された。次に、3 日齢の豚で認められた血清中の抗体応答の遅延は液性免疫機能の未熟に起因したと考えられた。

VLP の経鼻投与あるいは経口投与により抗体応答が誘導されて感染防御効果を示すことが明らかとなった。感染防御効果は濃度依存的に認められ、その効果は経鼻投与時に粘膜アジュバントであるコレラトキシンの添加の有無に影響されなかった。このことから VLP 自体が粘膜において高い免疫原性を有していると考えられた。また、VLP は経口投与においても高い感染防御効果を示したことから、VLP は胃酸や腸の蛋白質分解酵素に対して抵抗性を示すのではないかと推測された。さらに、VLP を 1-2 回と少回数投与した場合においても、経鼻投与群で 100%、経口投与群で 50%に感染防御効果が認められた。これらの結果より、豚での HEV の感染防御を図る上で VLP の経粘膜投与は非常に有効な方法であると考えられた。

紀伊半島から大阪府南部にかけて定点地区を設定し、過去 7 年間に亘り、野生イノシシを中心とした野生動物の HEV 遺伝子、抗体の保有状況について調査研究を行なった。併せて、ハンターの HEV 抗体保有状況や近隣の E 型肝炎散発発生例について、野生動物との関連性を検討してきた。その結果、紀伊半島南部には HEV 保有野生動物の可能性は極めて少なく、HEV 保有野生イノシシは和歌山県北部から大阪府南部地区に存在していること、ハンターの HEV

抗体保有も同地区からのみ検出されたこと、県境に近隣した和歌山市内での散発性 HEV 急性肝炎患者の HEV 遺伝子は G3 であることが判明した。野生イノシシの遺伝子検索により変異 HEV 保有を有するか否かの結論は導くことはできなかった。また、HEV 保有率の高い家畜ブタとの交雑の可能性は低いことが考えられた。

イノシシの肉は好んで喫食される。多くは加熱料理で喫食されるが、中にはレバーなどの生食を好む人もある。E 型肝炎の感染予防には、生肉食の習慣を絶たなければならないことは申すに及ばず、野生イノシシの HEV 保有状況を調査し、その成果を還元することが人の E 型肝炎予防に重要な疫学研究といえる。これまでの研究成果も含め、生肉食への警鐘をさらに強めたいと考える。

HEV 保有野生イノシシに特徴的な遺伝子が存在しているかの検討は、今回の調査研究からは十分な結論を出すに至らなかった。同一地域における HEV の自然史を調査することは、HEV 感染予防を考える上で何らかの形で継続しなければならないと考える。

## 2. HCV

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 VLP を作成しワクチンとして応用することを最終的な目標としている。3 年間の研究で HCV の subgenomic replicon を保持する細胞に HCV の構造蛋白を trans に供給することにより、HCV-LPs が培養上清中に放出されることが判明した。また、この HCV-LPs が感染性を有するかどうかの検討を行い、感染させた細胞の neomycin 耐性能を調べることにより感染性を証明することができた。また、replicon に外来遺伝子を導入することにより、外来遺伝子を感染細胞内で発現させることにも成功した。し

かしながらこの方法は、cell line を取得するまでに長時間を要し、変異導入による HCV 蛋白の機能解析には適当ではないため、プラスミドトランスフェクションにより感染性の HCV-LPs を作成する方法を確立し、本手法を用いて NS2 の感染性への関与を検討した。その結果、NS2 の N 末端側の膜貫通領域や C 末端のアミノ酸が感染性に必須であることを示すことが出来た。

この系を用いれば、他の遺伝子型の粒子形成についても迅速な評価が可能となるものと考えられる。またこのシステムは、HCV の生活環の中でも、HCV のゲノムパッケージングや粒子形成等のステップを解明するのに有用であるばかりでなく、薬剤のスクリーニングにも利用可能であると考えられる。さらに今回の HCV 様粒子作製法の確立は、安全性が高く、CTL の誘導が可能なワクチン開発へ道を拓くものと期待される。また、外来遺伝子を細胞内へ導入し発現させるベクターとしても応用可能である。

HCV の粒子産生系の検討において、HCV J6/JFH1 株感染 Huh-7.5 細胞を継代培養し、継代に応じて感染力価は P-1 株に比べて 10-100 倍上昇した。P-47 株感染細胞は持続感染状態を維持し高い感染力価のウイルスを産生し続けることが示された。感染価の上昇には HCV ゲノムへの適合変異が関与していると考えられた。ここでは、E2 の N534H 変異が CD81 依存性の HCV 感染侵入効率を上昇させることが示された。HCV E2 glycoprotein は、細胞表面上の CD81 などのウイルス受容体と結合する事で、HCV の侵入に関わる領域である。E2 上の 534 番目のアミノ酸は 11 個ある内の 6 番目の N-グリコシレーションサイトであり、HCV の侵入や、中和抗体に対する防御上、重要なアミノ酸とされている。534 番目のアミノ酸がアスパラギンからヒスチジンに変異することにより、糖鎖付

加の欠失が起こり、CD81 と E2 の結合に変化をもたらす可能性が示された。

さらに、HCV J6/JFH1 株を用いて focus reduction neutralization assay を行い、中和抗体価を算出できるようになった。EVR, SVR の患者では non-EVR, non-SVR の患者に比し、中和抗体価が有意に高かった。今後、更に検体数を増やして中和抗体価と感染防御の関係を明らかにする必要がある。

### 3. HBV

HBV genotype A 株 (HBV-Ae) は genotype C 株 (HBV-CA) に比べ HBs 抗原分泌効率が顕著に高い。今回、分泌効率が異なるクローンのキメラ遺伝子を作製し、HBs 抗原分泌効率を比較するための発現系を構築した。HBV はヌクレオカプシドなしに S-HBsAg でコートされた中空粒子 subviral particles (SVPs) を形成する。HBV の small S 蛋白は高免疫原性で、HB ワクチンとして世界中で使用されている。また、SVP の分泌は L-HBsAg や M-HBsAg と independent に起こるとされているが、mature virion の分泌は L-HBsAg と S-HBsAg が必要であり、M-HBsAg は必須でないと報告されている。現在までに、分泌を低下させるアミノ酸変異としては、Virion: G145R、SVPs: R79K、Virion & SVPs: L77R、R169P、SVPs: L215Q 等が報告されているが、今回比較したクローンではアミノ酸は保存されていて、配列は同一であった。しかし、本研究により、preS1-preS2 領域にも S 抗原分泌を制御する配列が存在する可能性が示され、preS1 領域から発現させることにより、各遺伝子型の S 抗原を効率良く分泌させることができる可能性が示された。SVPs の細胞外への放出の分子機構を解析し、組み換え HBs 抗原粒子を効率よく細胞外へ分泌させる技術を確立するためには preS1-preS2 のどの領域が重要であるかを更に明らかにする必要がある。

#### 4. MCV

MCV はヒトメルケル細胞がんから遺伝子がクローン化された新規ウイルスで、2008年2月はじめて報告された。これまでのヒトポリオーマウイルスとは違いがん組織で T 抗原遺伝子の組み込みが確認されていることから、発がんとの関連が強く示唆されている。しかしながら、その生活環、感染様式はもとより、関連する疾患は他にないかは全くと言ってよいほどわかっていない。MCV-LP 作製法の確立は、診断法の開発に有用であるだけでなく、粒子構造の解析、レセプター探索へ道を拓くものである。

実際に、MCV-LP を使って抗体検出系を作製し、これにより我が国圏常人各年代の抗 MCV 抗体陽性率を明らかにした。今後、種々の疾患患者における抗体保有率調査を含め詳細な血清疫学解析を行うと共に、精製 VLP を用いた MCV の粒子構造解析等を進める予定である。

#### E. 結論

HEV では、HEV-LP のワクチン化に向けた基盤研究の他に、野生動物での疫学調査、感染培養細胞系の確立、またネイティブ粒子様 VLP の作製などの成果を得た。

HCV では、一過性に感染するが増殖しない HCV-LP の作製、また中和抗体測定法の開発を行った。

HBV では粒子分泌を規定する PreS 領域を明らかにした。

MCV では VLP 作製と精製に成功し、これを使った抗 MCV 抗体測定系を開発し我が国健康者における同抗体保有率を明らかにした。

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 研究発表

論文発表

1. Suzuki T, Aizaki H, Murakami K, Shoji I, and Wakita T. Molecular biology of hepatitis C virus. *J Gastroenterol.*, 2007, 42: 411-423.
2. Murakami K, Inoue Y, Hmwe SS, 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. *J Virol Methods.*, 2008, 148, 174-181.
3. Matsuura Y, Suzuki M, Yoshimatsu K, Arikawa J, Takashima I, Yokoyama M, Igota H, Yamauchi K, Ishida S, Fukui D, Bando G, Kosuge M, Tsunemitsu H, Koshimoto C, Sakae K, Chikahira M, Ogawa S, Miyamura T, Takeda N, Li TC, 2007. Prevalence of antibody to hepatitis E virus among wild sika deer, *Cervus nippon*, in Japan. *Arch Virol* 152: 1375-81.
4. Li TC, Miyamura T, Takeda N, 2007. Detection of hepatitis e virus RNA from the bivalve yamato-shijimi (*corbicula japonica*) in Japan. *Am J Trop Med Hyg* 76: 170-2
5. Mochizuki M, Ouchi A, Kawakami K, Ishida T, Li TC, Takeda N, Ikeda H, Tsunemitsu H, 2006. Epidemiological study of hepatitis E virus infection of dogs and cats in Japan. *Vet Rec* 159: 853-4.
6. Yamamoto H, Li TC, Koshimoto C, Itoh K, Miyashita N, Arikawa J, Yagami K, Asano M, Tezuka H, Suzuki N, Kurosawa T, Shibahara T, Furuya M, Mori S, Satoh H, Ohsawa K, Ibuki K, Lee S, Kita M, Takeda N. Serological Evidence for Hepatitis E



- Virus Infection in Laboratory Monkeys and Pigs in Japan. 2008. *Exp. Animals*. In press
7. Suzuki T., Ishii K., Aizaki H. and Wakita T. Hepatitis C viral life cycle. *Advanced Drug Delivery Reviews* 59: 411-423 (2007).
  8. 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).
  9. Murayama A., Date T., Morikawa K., Akazawa D., Miyamoto N., Kaga M., Ishii K., Suzuki T., Kato T., Mizokami M. and Wakita T. NS3 helicase and NS5B to 3' X regions are important for efficient JFH-1 replication in Huh7 cells. *Journal of Virology* 81: 8030-8040 (2007)
  10. 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).
  11. 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).
  12. 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).
  13. 田中智之、武田直和 ノロウイルスの現状と院内感染対策。 *感染症* 37(3): 94-104, 2007
  14. 田中智之、奥田真珠美 ウイルス性胃腸炎診断法の進歩と院内感染予防対策。 *小児科診療* 70(6): 985-990, 2007
  15. 田中智之、三好龍也、内野清子、武田直和 院内発生時における感染拡大防止対策—ノロウイルス 月刊薬事 49(11): 37-42, 2007
  16. 田中智之、三好龍也、内野清子、武田直和 調理従事者を介して起こるノロウイルス食中毒 食と健康 10: 6-14, 2007
  17. 田中智之、加藤大介、鎌田公仁夫、三好龍也、内野清子、吉田永祥、田尻 仁、奥田真珠美、中山佳子、平山吉郎、北元憲利、武田直和 ノロウイルス迅速抗原検査検査と技術 36(3): 235-239, 2007
  18. 恒光 裕. E型肝炎. 人獣共通感染症、養賢堂 39-45, 2007.
  19. 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)
  20. 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)
21. Naotaka Ishiguro, Yasuo Inoshima, Kazuo Suzuki, Tatsuya Miyoshi and Tomoyuki Tanaka. Construction of three-year genetic profile of Japanese wild boars in Wakayama prefecture, to estimate gene flow from crossbred Inobuta into boar populations. *Mammal Study* 33:43-49, 2008
  22. Murakami, K., Kimura, T., Osaki, M., Ishii, K., Miyamura, T., Suzuki, T., Wakita, T., and Shoji, I. Virological characterization of the HCV JFH-1 strain in lymphocytic cell lines. *Journal of General Virology*, 89, 1587-92, 2008.
  23. Sasase, N., Kim, S.R., Kim, K.I., Taniguchi, M., Imoto, S., Mita, K., Hotta, H., Shoji, I., El-Shamy, A., Kawada, N., Kudo, M., and Hayashi, Y. Usefulness of a new immunoradiometric assay of HCV core antigen to predict virological response during PEG-IFN/RBV combination therapy for chronic hepatitis with high viral load of serum HCV RNA genotype 1b. *Intervirology*, 51, 70-5, 2008.
  24. Deng, L., Adachi, T., Kitayama, K., Bungyoku, Y., Kitazawa, S., Ishido, S., Shoji, I., and Hotta, H. Hepatitis C virus infection induces apoptosis through a Bax-triggered, mitochondria-mediated, Caspase-3-dependent pathway. *Journal of Virology*, 82, 10375-85, 2008.
  25. Suzuki, R., Moriishi, K., Fukuda, K., Shirakura, M., Ishii, K., Shoji, I., Wakita, T., Miyamura, T., Matsuura, Y., and Suzuki, T. Proteasomal turnover of hepatitis C virus core protein is regulated by dual mechanisms, ubiquitin-dependent and ubiquitin-independent but PA28gamma-dependent. *Journal of Virology*, [epub ahead of print], 2008.
  26. Shimoji, T., Murakami, K., Sugiyama, Y., Matsuda, M., Inubushi, S., Nasu, J., Shirakura, M., Suzuki, T., Wakita, T., Kishino, T., Hotta, H., Miyamura, T., and Shoji, I. Identification of annexin A1 as a novel substrate for E6AP-mediated ubiquitylation. *Journal of Cellular Biochemistry*, in press.
  27. Wang CY, Miyazaki N, Yamashita T, Higashiura A, Nakagawa A, T-C Li, Takeda N, Xing L, Hjalmarsson E, Friberg C, Liou DM, Sung YJ, Tsukihara T, Matsuura Y, Miyamura T, Cheng RH. Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of recombinant hepatitis E virus-like particle. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun*. 2008 Apr 1;64(Pt 4):318-22. Epub 2008 Mar 29.
  28. Yamamoto H, Li TC, Koshimoto C, Ito K, Kita M, Miyashita N, Arikawa J, Yagami K, Asano M, Tezuka H, Suzuki N, Kurosawa T, Shibahara T, Furuya M, Mohri S, Sato H, Ohsawa K, Ibuki K, Takeda N. Serological evidence for hepatitis e virus infection in laboratory monkeys and pigs in animal facilities in Japan. *Exp Anim*. 2008 Jul;57(4):367-76.
  29. Gran S, Hansman, Tmoichiro Oka, T-C Li, Osamu Nishio, Mamoru Noda, and Naokazu Takeda. Detection of Human Enteric

- Viruses in Japanese Clams. *Journal of Food Protection*. 2008 Aug; 71(8): 1689-95.
30. T-C Li, Yuriko Suzaki, Yasushi Ami, Hiroshi Tsunemitsu Tatsuo Miyamura, and Naokazu Takeda. Mice are not susceptible to hepatitis E virus infection *The Journal of Veterinary Medical Science* . 2008. Dec;70(12):1359-62.
  31. Liu LJ, Suzuki T, Tsunemitsu H, Kataoka M, Ngata N, Takeda N, Wakita T, Miyamura T, Li TC. Efficient production of type 2 porcine circovirus-like particles by a recombinant baculovirus. *Arch Virol*. Nov 9, 2008.
  32. Sugitani M, Tamura A, Shimizu YK, Sheikh A, Kinukawa N, Shimizu K, Moriyama M, Komiyama K, Li TC, Takeda N, Arakawa Y, Suzuki K, Ishaque SM, Roy PK, Raihan A, Hasan M. Detection of hepatitis E virus RNA and genotype in Bangladesh. *J Gastroenterol Hepatol*. 2008 Dec 1.
  33. Ishii K., Hasegawa H., Nagata N., Ami Y., Fukushi S., Taguchi F. and Tsunetsugu-Yokota Y. Vaccine-induced neutralizing antibody against SARS-CoV Spike is highly effective for the protection of mice in the murine SARS model. *Microbiology and Immunology* in press.
  34. Akazawa D., Date T., Morikawa K., Murayama A., Omi N., Takahashi H., Nakamura N., Ishii K., Suzuki T., Mizokami M., Mochizuki H. and Wakita T. Characterization of infectious hepatitis C virus from liver-derived cell lines. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 371: 747-751 (2008)
  35. Shirato H., Ogawa S., Ito H., Sato T., Kameyama A., Narimatsu H., Zheng X., Miyamura T., Wakita T., Ishii K. and Takeda N. Noroviruses distinguish type 1 and type 2 histo-blood group antigens for binding. *Journal of Virology* 82: 10756-10767 (2008)
  36. Masaki T., Suzuki R., Murakami K., Aizaki H., Ishii K., Murayama A., Date T., Matsuura Y., Miyamura T., Wakita T. and Suzuki T. Interaction of hepatitis C virus nonstructural protein 5A with core protein is critical for the production of infectious virus particles. *Journal of Virology* 82: 7964-7976 (2008)
  37. Ishii K., Murakami K., Hmwe S., Zhang B., Li J., Shirakura M., Morikawa K., Suzuki R., Miyamura T., Wakita T. and Suzuki T. Trans-encapsidation of hepatitis C virus subgenomic replicon RNA with viral structure proteins. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 371: 446-450 (2008)
  38. Aizaki, H., Morikawa, K., Fukasawa, M., Hara, H., Inoue, Y., Tani, H., Saito, K., Nishijima, M., Hanada, K., Matsuura, Y., Lai, M.M., Miyamura, T., Wakita, T., Suzuki, T. A Critical Role of Virion-Associated Cholesterol and Sphingolipid in Hepatitis C Virus Infection. *J. Virol.* 82: 5715-5724 (2008).
  39. Okamoto K., Mori Y., Komoda Y., Okamoto T., Okochi M., Takeda M., Suzuki T.,

- Moriishi K., and Matsuura Y. Intramembrane processing by signal peptide peptidase regulates the membrane localization of hepatitis C virus core protein and viral propagation. *J. Virol.* 82: 8349-8361 (2008).
40. Okamoto T., Omori H., Kaname Y., Abe T., Nishimura Y., Suzuki T., Miyamura T., Yoshimori T., Moriishi K., and Matsuura Y. A single amino acid mutation in hepatitis C virus NS5A disrupting FKBP8 interaction impairs viral replication. *J. Virol.* 82: 3480-3489 (2008).
41. Taguwa S., Okamoto T., Abe T., Mori Y., Suzuki T., Moriishi K., and Matsuura Y. Human butyrate-induced transcript 1 interacts with hepatitis C virus NS5A and regulates viral replication. *J. Virol.* 82: 2631-2641 (2008).
42. Omata, K., Suzuki, R., Masaki, T., Miyamura, T., Satoh, T., Suzuki, T. Identification and characterization of the human inhibitor of caspase-activated DNase gene promoter. *Apoptosis.* 13: 929-937 (2008).
43. Aizaki H, and Suzuki T. RNA Replication of Hepatitis C Virus. Cheng RH, and Miyamura T in *Structure-based Study of Viral Replication*, World Scientific, Singapore, 2008, pp151-172.
44. 田中 智之. ノロウイルス胃腸炎の診断と予防指針 総合臨床 2008, 57:2002-2003
45. 田中 智之. 各種迅速診断法 消化管の感染症 2) ウイルス性胃腸炎 2008, *Medical Technology* 36;1393-1399.
46. 金守良、井本勉、婦木秀一、金啓二、谷口美幸、長野基子、堀田博、勝二郁夫、寒原芳浩、前川陽子、工藤正俊、林祥剛. 1b型高ウイルス量高齢者 C 型慢性肝炎に対する PEG IFN $\alpha$ -2 b/リバビリン治療（併用療法）の検討. *肝臓*, 49, 145-152, 2008.
47. 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
48. 清原知子、石井孝司、脇田隆宇 A 型肝炎 臨床と微生物 35: 645-650 (2008)
49. 李 天成、石井孝司、武田直和 E 型肝炎と豚肉、鹿肉、猪肉の安全性 臨床とウイルス 36: 298-304 (2008)
50. 白土東子、武田直和、石井孝司 ノロウイルスと血液型抗原との結合 遺伝子医学 MOOK 11:192-198 (2008)
51. 石井孝司 遺伝子組換え生ワクチン 日本臨床 66: 1903-1907 (2008)
52. Hara H, Aizaki H, Matsuda M, Shinkai-Ouchi F, Inoue Y, Murakami K, Shoji I, Kawakami H, Matsuura Y, Lai MMC, Miyamura T, Wakita T, Suzuki T: Involvement of creatine kinase B in hepatitis C virus genome replication through interaction with the viral NS4A protein. *J Virol* 5137-5147 5137-5147, 2009.
53. Suzuki, R., Moriishi, K., Fukuda, K., Shirakura, M., Ishii, K., Wakita, T., Miyamura, T., Matsuura, Y., Suzuki, T: Proteasomal turnover of hepatitis C virus core protein is regulated by two distinct mechanisms: ubiquitin-dependent and ubiquitin-independent but PA28gamma-dependent. *J Virol* 83: 2389-2392, 2009.