

平成 21 年度 新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業 成果概要

研究課題： ウイルス感染症の効果的制御のための病原体サーベイランスシステムの検討課題番号：H19-新興一般-013研究代表者：清水 博之**I. 研究の意義**

- (1) ポリオ流行国は 4 ヶ国に減少したが、VDPV によるポリオ流行等、世界ポリオ根絶達成にとって重要な新たな技術的課題が生じている。病原体サーベイランスの質的向上により、ポリオフリーの維持を図るとともに、重症エンテロウイルス感染症の制御を含む、世界ポリオ根絶達成後を見ずえた研究が必要とされる。
- (2) 日本では 2012 年までの麻疹排除を目指している。WHO は、検査診断による精度の高いサーベイランス体制のもとで、人口 100 万人あたり患者 1 人未満の状況が 1 年以上継続する事を麻疹排除の要件としている。我が国では 2008 年に全数届出制が導入されたがいまだ臨床診断が多く、検査診断による麻疹サーベイランス体制は十分ではなく、検査の精度管理体制の整備が必要。
- (3) 急性呼吸器感染症 (ARI) のうち、多くの ARI ウイルスの病原体サーベイランスは、いまだ十分に機能しておらず、病原体サーベイランス体制の確立が必要とされている。

II. 研究の目的、期待される成果

- (1) ポリオおよびエンテロウイルスについては、様々なサーベイランス手法および新たな実験室診断技術の開発および評価・検討を行うとともに、国内および西太平洋地域のポリオフリーの維持を確認する。ポリオサーベイランスシステムを、国内外の重症エンテロウイルス感染症の病原体サーベイランスに応用する。
- (2) 2008 年に導入された麻疹症例全数報告に対応し、標準的麻疹診断方法を決定する。また、National Laboratory (感染研) による精度管理体制を構築し、標準的麻疹診断方法の感度・精度を評価する。国内麻疹ウイルス分離株の遺伝子情報を収集する。以上により、WHO による麻疹排除の要件を満たせるような麻疹サーベイランス体制を確立する。
- (3) 地方衛生研究所を中心とした実験室ネットワークを活用することにより、日常的に検出される呼吸器・腸管感染症を対象とした病原体サーベイランスシステムを整備する。

III. 3 年間の研究成果

・研究代表者

- (1) エンテロウイルス感染増殖・病原性発現機構解明の一環として、エンテロウイルス 71 特異的宿主受容体分子の探索を行い、リンパ球への EV71 感染に関与する宿主受容体 PSGL-1 を同定した。
- (2) AFP および追加サーベイランスにより、国内および西太平洋地域のポリオフリーの確認を行うとともに、VDPV によるポリオ流行のリスクを明らかにした。
- (3) 腸管ウイルスの感染動物モデルおよび新たなポリオウイルス検査法について検討評価した。
- (4) 我が国の野生株ポリオウイルス実験室封じ込め報告書を作成し WHO/WPRO に提出した。

・研究分担者 (駒瀬勝啓、麻疹ウイルス研究小班統括)

- (1) 地方衛生研究所から 10 カ所の麻疹・風疹レファレンスセンターを選び、感染研、地方衛生研究所を結んだ麻疹・風疹診断ネットワークを立ち上げた。
- (2) 麻疹診断の標準法として RT-PCR を定め、精度管理のための参照 RNA を全地方衛生研究所に配布した。
- (3) 麻疹・風疹レファレンスセンターに IgM 測定用の血清を配布し、IgM 測定精度管理試験を実施した。

・研究分担者(野田雅博、呼吸器ウイルス研究小班統括)

- (1) 代表的な ARI ウイルスである RS ウイルス、ヒトメタニューモウイルス等のレファレンス体制構築を図り、病原体サーベイランスを実施した。その結果、これまで不明であったそれぞれの ARI ウイルス感染実態が明らかとなった。
- (2) ARI ウイルスのサーベイランスを実施するうえでの技術的な一助として病原体検出マニュアル(ライノウイルス、パラインフルエンザウイルス、ボカウイルス)を策定した。

・研究分担者(多屋馨子)

- (1) 麻疹重症化の実態を具体的に示すため、麻疹重症化例に関する疫学的調査を行った。
- (2) 2012 年までの国内麻疹排除達成のため、教育機関、行政機関、医療機関等に対する麻疹教育啓発活動を実施した。

・研究分担者(小池智、帖佐徹、岩井雅恵、吉田弘、有田峰太郎、西村順裕)

- (1) エンテロウイルス 71 特異的宿主受容体分子の探索を行い、異なる構造および機能を有する二種類の受容体を同定し、EV71 結合特異性等の解析を行った。
- (2) ウイルス RNA センサーノックアウトマウスを用いてポリオウイルス感染防御機構を解析し、生体内におけるポリオウイルス伝播・病原性発現機構の一端を明らかにした。
- (3) 地域内のポリオウイルスの伝播を監視するために、下水流入水中のポリオウイルスの検出とウイルス学的解析を行った。
- (4) 中国山東省 CDC 等との共同研究により、環境水ウイルス調査手法の技術導入を実施した。
- (5) EV71 マウス感染系を確立し、抗エンテロウイルス剤として有望な化合物を同定した。
- (6) 糞便等の臨床検体からエンテロウイルス遺伝子を検出する手法の有用性を評価した。

IV. 今後考えられる新たな課題

- (1) 国内およびアジア地域におけるポリオフリーを、より高い精度で確認するため、新たなサーベイランス手法についての評価を継続する。ポリオサーベイランスと実験室ネットワークを発展的に活用し、近年、我が国の周辺国で多発している重症エンテロウイルス感染症流行を迅速に把握するための国際的病原体サーベイランス体制確立への応用をはかる。
- (2) エンテロウイルス 71 受容体の同定等、本研究事業で得られた重要な基礎研究成果を、新たなエンテロウイルス実験室診断法あるいは重症エンテロウイルス感染症の予防治療法の開発に応用する。また、ヒトにおけるエンテロウイルス感染伝播、病原性発現を反映する小動物モデルの作製を行う。
- (3) 2012 年の国内麻疹排除達成に向けて、地方衛生研究所ネットワークによる麻疹検査診断の受け皿はほぼ準備されたが、臨床検体を効率的に地方衛生研究所に集めて確定診断を行うシステムは確立されていない。保健所等による検体収集体制について状況を把握し、改善する必要がある。
- (4) 麻疹の検査診断の必要性を医療関係者に十分周知できなかったため、今後啓蒙につとめる必要がある。
- (5) 本研究事業により、多様な ARI ウイルスが国内で日常的に伝播していることが明らかとなった。ARI ウイルス伝播の把握のためには、地方衛生研究所を中心としたレファレンス活動が重要であり、ARI ウイルスについて更に詳細な病原体サーベイランスを継続する。

V. 行政施策への貢献の可能性

- (1) 近年アジア地域で多発している、重症エンテロウイルス感染症流行を迅速に把握するための国内外におけるエンテロウイルス病原体サーベイランス体制の確立。
- (2) 国内におけるポリオフリーを確認し、WHO 年次レポート等により随時報告する。
- (3) 地方衛生研究所ネットワークの整備を基盤とした麻疹全数報告確定診断の精度向上による 2012 年までの麻疹排除への貢献。
- (4) 病原体検出マニュアル等の整備により、地方衛生研究所ネットワークを中心とした ARI ウイルスに対するレファレンス活動を強化する。

VI. 本研究の成果(発表論文・ガイドライン・マニュアル等)

【研究代表者】(清水博之)

1. Nishimura Y, Shimojima M, Tano Y, Miyamura T, Wakita T, Shimizu H: Human P-selectin glycoprotein ligand-1 is a functional receptor for enterovirus 71. *Nat Med* 15: 794-7, 2009
2. Arita M, Ling H, Yan D, Nishimura Y, Yoshida H, Wakita T, Shimizu H: Development of a reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) system for a highly sensitive detection of enterovirus in the stool samples of acute flaccid paralysis cases. *BMC Infect Dis* (in press)
3. Zhang Y, Wang HY, Zhu SL, Li Y, Song LZ, Liu Y, Liu GF, Nishimura Y, Chen L, Yan DM, Wang DY, An HQ, Shimizu H, Xu AQ, Xu WB: Characterization of a Rare Natural Intertypic Type 2/Type 3 Penta-Recombinant Vaccine-Derived Poliovirus Isolated from a Child with Acute Flaccid Paralysis. *J Gen Virol*: 2009 (in press)
4. Mizuta K, Aoki Y, Suto A, Ootani K, Katsushima N, Itagaki T, Ohmi A, Okamoto M, Nishimura H, Matsuzaki Y, Hongo S, Sugawara K, Shimizu H, Ahiko T: Cross-antigenicity among EV71 strains from different genogroups isolated in Yamagata, Japan, between 1990 and 2007. *Vaccine* 27: 3153-8, 2009
5. Goto K, Sanefuji M, Kusuhara K, Nishimura Y, Shimizu H, Kira R, Torisu H, Hara T: Rhombencephalitis and coxsackievirus A16. *Emerg Infect Dis* 15: 1689-91, 2009
6. Arita M, Wakita T, Shimizu H: Cellular kinase inhibitors that suppress enterovirus replication have a conserved target in viral protein 3A similar to that of enviroxime. *J Gen Virol* 90: 1869-79, 2009
7. Thorley B, Kelly H, Nishimura Y, Yoon YK, Brussen KA, Roberts J, Shimizu H: Oral poliovirus vaccine type 3 from a patient with transverse myelitis is neurovirulent in a transgenic mouse model. *J Clin Virol* 44: 268-71, 2009
8. Arita M, Wakita T, Shimizu H: Characterization of pharmacologically active compounds that inhibit poliovirus and enterovirus 71 infection. *J Gen Virol* 89: 2518-2530, 2008
9. Hamaguchi T, Fujisawa H, Sakai K, Okino S, Kurosaki N, Nishimura Y, Shimizu H, Yamada M: Acute encephalitis in an adult due to intrafamilial transmission of enterovirus 71. *Emerg Infect Dis* 14:828-830, 2008
10. Arita M, Ami Y, Wakita T, Shimizu H: Cooperative effect of the attenuation determinants derived from poliovirus Sabin 1 strain is essential for attenuation of enterovirus 71 in the NOD/SCID mouse infection model. *J Virol* 82: 1787-1797, 2008
11. Bingjun T, Yoshida H, Yan W, Lin L, Tsuji T, Shimizu H, Miyamura T: Molecular typing and epidemiology of non-polio enteroviruses isolated from Yunnan Province, the People's Republic of China. *J Med Virol* 80: 670-679, 2008
12. Tano Y, Shimizu H, Martin J, Nishimura Y, Simizu B, Miyamura T: Antigenic characterization of a formalin-inactivated poliovirus vaccine derived from live-attenuated Sabinstrains. *Vaccine* 25: 7041-6, 2007
13. Arita M, Nagata N, Iwata N, Ami Y, Suzaki Y, Mizuta K, Iwasaki T, Sata T, Wakita T, Shimizu H: An attenuated strain of enterovirus 71 belonging to genotype a showed a broad spectrum of antigenicity with attenuated neurovirulence in cynomolgus monkeys. *J Virol* 81: 9386-95, 2007.
14. Mizutani T, Endoh D, Okamoto M, Shirato K, Shimizu H, Arita M, Fukushi S, Saijo M, Sakai K, Limn CK, 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. *Emerg Infect Dis* 13: 322-24, 2007

【研究分担者】(駒瀬勝啓)

1. Dong JB, Saito A, Mine Y, Sakuraba Y, Nibe K, Goto Y, Komase K, Nakayama T, Miyata H, Iwata H, Haga T. Adaptation of wild-type measles virus to cotton rat lung cells: E89K mutation in matrix protein contributes to its fitness. *Virus Genes*. 2009 [Epub ahead of print]
2. Kato S, Ohgimoto S, Sharma LB, Kurazono S, Ayata M, Komase K, Takeda M, Takeuchi K, Ihara T, Ogura H. Vaccine Reduced ability of hemagglutinin of the CAM-70 measles virus vaccine strain to use receptors CD46 and SLAM. *Vaccine* 27:3838-48, 2009
3. Sakata M, Komase K, Nakayama T. Histidine at position 1042 of the p150 region of a KRT live attenuated rubella vaccine strain is responsible for the temperature sensitivity. *Vaccine*. 27: 234-42, 2009

【研究分担者】(野田雅博)

1. Hishinuma-Igarashi I, Mizuta K, Saito Y, Ohuchi Y, Noda M, Akiyama M, Sato H, Tsukagoshi H, Okabe N, Tashiro M, Kimura H. Phylogenetic analysis of human bocavirus (HBoV) detected from children with acute respiratory infection in Japan. *J Infect*. 58:311-313, 2009
2. Mizuta K, Matsuzaki Y, Hongo S, Ohmi A, Okamoto M, Nishimura H, Itagaki T, Katsushima N, Oshitani H, Suzuki A, Furuse Y, Noda M, Kimura H, Ahiko T. Stability of seven hexon hypervariable region sequences of adenovirus types 1-6 isolated in Yamagata, Japan between 1988 and 2007. *Virus Res* 140:32-39, 2009

【研究分担者】(小池 智)

1. Yamayoshi S, Yamashita Y, Li J, Hanagata N, Minowa T, Takemura T, Koike S: Scavenger receptor B2 is a cellular receptor for enterovirus 71. *Nat Med* 15: 798-801, 2009
2. Ohka S, Igarashi H, Nagata N, Sakai M, Koike S, Nochi T, Kiyono H, & Nomoto A. Establishment of a poliovirus oral infection system in human poliovirus receptor-expressing transgenic mice that are deficient in alpha/beta interferon receptor. *J Virol* 81: 7902-7912. 2007

厚生労働科学研究費補助金 インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業
ウイルス感染症の効果的制御のための病原体サーベイランスシステムの検討

ウイルス感染症の効果的制御のための 病原体サーベイランスシステムの検討 (H19-新興-一般-013)

研究代表者
清水博之

国立感染症研究所 ウイルス第二部
清水博之

厚生労働科学研究費補助金 インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業
ウイルス感染症の効果的制御のための病原体サーベイランスシステムの検討

研究組織

研究代表者 [腸管ウイルス研究小班担当]
清水 博之 (国立感染症研究所 ウイルス第二部)

研究分担者

多摩 肇子 (国立感染症研究所 感染症情報センター)
小池 智 (東京都神経科総合研究所)
帖佐 徹 (財)九州産業衛生協会)
岩井 雅恵 (富山県衛生研究所)
吉田 弘 (国立感染症研究所 ウイルス第二部)
有田 峰太郎 (国立感染症研究所 ウイルス第二部)
西村 順裕 (国立感染症研究所 ウイルス第二部)
野田 雅博 (国立感染症研究所 ウイルス第三部)
[呼吸器ウイルス研究小班担当]

駒瀬 勝啓 (国立感染症研究所 ウイルス第三部)
[麻疹ウイルス研究小班担当]

研究課題および目的

麻疹 (WHO/WPRO麻疹撲滅計画への貢献)
保健所-地帯研-感染研による麻疹検査診断ネットワークの構築
麻疹実験室診断手法の標準化と精度管理 (検査診断用RT-PCR法の確立)
麻疹検査診断フローチャートの整備
麻疹ワクチン接種率向上への取り組み

呼吸器・腸管ウイルス感染症 (病原体サーベイランス体制の確立)

日本および周辺地域に常在する呼吸器・腸管ウイルスのサーベイランスおよび実験室診断手法の研究 (RSV, hMPV, パライフルエンザ、ライノ、ボカ、ハレコ等)
重症呼吸器・腸管ウイルス感染症のサーベイランス
呼吸器・腸管ウイルス増殖・病原性発現機構の研究

ポリオ・エンテロウイルス感染症 (WHO世界ポリオ根絶計画への寄与)

感度および精度の高いポリオ・エンテロウイルス病原体サーベイランス手法の研究
野生株ポリオウイルス実験室封じ込めへの推進
IPV導入後のポリオサーベイランス手法の研究
ポリオ・エンテロウイルス感染伝播・病原性発現機構の研究

厚生労働科学研究費補助金 インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業
ウイルス感染症の効果的制御のための病原体サーベイランスシステムの検討

研究課題および目的

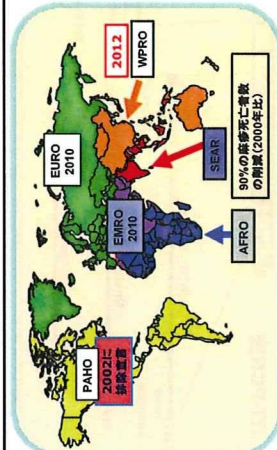
麻疹 (WHO/WPRO麻疹撲滅計画への貢献)
保健所-地帯研-感染研による麻疹検査診断ネットワークの構築
麻疹実験室診断手法の標準化と精度管理 (検査診断用RT-PCR法の確立)
麻疹検査診断フローチャートの整備
麻疹ワクチン接種率向上への取り組み

呼吸器・腸管ウイルス感染症 (病原体サーベイランス体制の確立)

日本および周辺地域に常在する呼吸器・腸管ウイルスのサーベイランスおよび実験室診断手法の研究 (RSV, hMPV, パライフルエンザ、ライノ、ボカ、ハレコ等)
重症呼吸器・腸管ウイルス感染症のサーベイランス
呼吸器・腸管ウイルス増殖・病原性発現機構の研究

ポリオ・エンテロウイルス感染症 (WHO世界ポリオ根絶計画への寄与)

感度および精度の高いポリオ・エンテロウイルス病原体サーベイランス手法の研究
野生株ポリオウイルス実験室封じ込めへの推進
IPV導入後のポリオサーベイランス手法の研究
ポリオ・エンテロウイルス感染伝播・病原性発現機構の研究



WHOによる麻疹排除の定義

適切なサーベイランスのもとで、常在性の麻疹ウイルスによる麻疹症例が12ヶ月以上ないこと
適切なサーベイランス (WHO)
全数報告
WHOに認定された組織 (感染研)による精度管理された実験室診断体制
WHO達成指標を目指したサーベイランス精度
ウイルス遺伝子解析 etc

WHOは麻疹排除の定義を設定し、その要件として精度の高いサーベイランス体制を求めている

日本を含むWHO 西太平洋地域では2012年までの麻疹撲滅を目標している。
日本においては2007年12月に「麻疹に関する特定感染症予防指針」を告示し、2008年より補足的MRワクチン接種、患者全数報告制を導入した。

保健所-地衛研-感染症による 麻疹検査診断ネットワークの構築

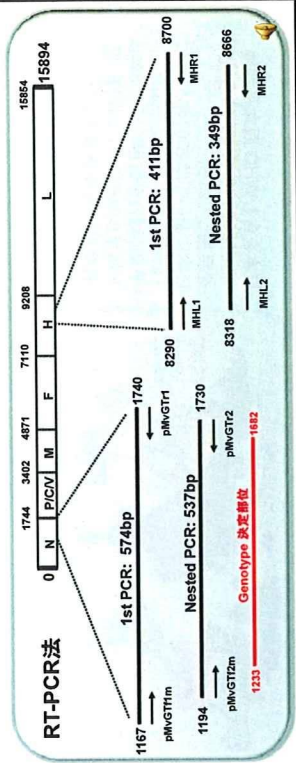
WHO
厚労省



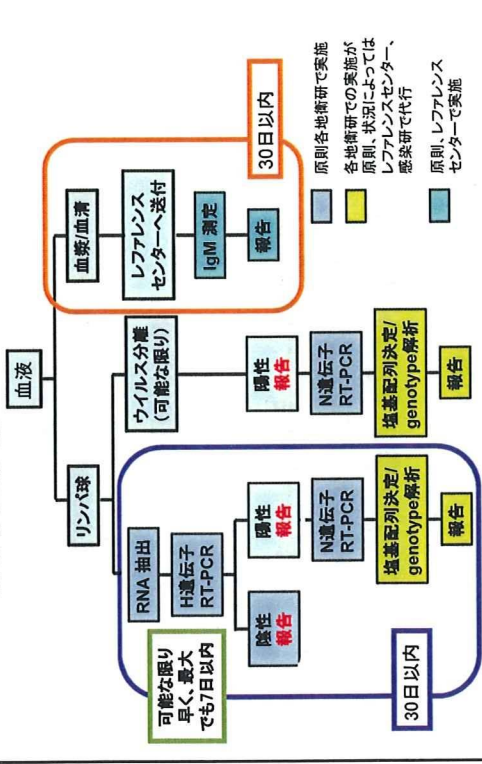
検査診断用RT-PCR法の策定と 精度管理用 Reference RNA の作製

- ワウチン株のゲノムcDNAより合成したRNA
- ゲノムの約90%をカバー
- 5 copy/μlに調整

Reference RNA



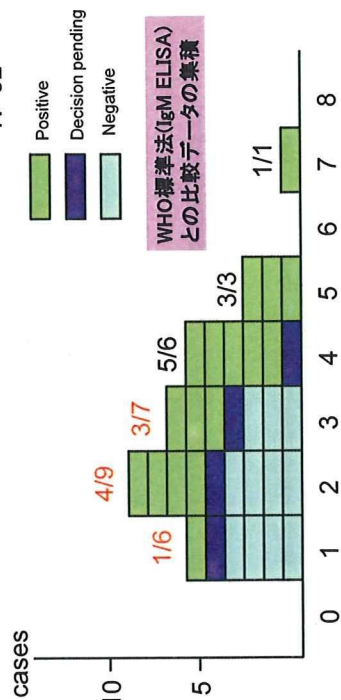
麻疹検査診断フローチャートの整備



病日によるRT-PCR法とIgM ELISAの感度の比較

RT-PCR陽性検体におけるIgM ELISAの結果

N=32



小川知子 (千葉県衛生研究所)からの結果

厚生労働科学研究費補助金 インフルエンザ等新規・再興感染症研究事業
ウイルス感染症の効果的制御のための病原体サーベイランスシステムの検討
研究対象と方法 (呼吸器ウイルス研究小班)

研究対象とした急性呼吸器 (ARI) ウイルス

RSウイルス (RSV)
ヒトメタニューモウイルス (hMPV)
パラインフルエンザウイルス (PIV)
ライノウイルス (RV)
ボカウイルス (BoCV) など

研究目的 (地方衛生研究所実験室ネットワークを活用)

- ARIウイルス病原体サーベイランス体制の構築
- ARIウイルス感染症の病態解明
- 臨床分離株の系統保存と遺伝子情報の集積
- ARIウイルスの標準検査法の確立と普及
- ARIウイルス検査標準品の供給体制の構築

厚生労働科学研究費補助金 インフルエンザ等新規・再興感染症研究事業
ウイルス感染症の効果的制御のための病原体サーベイランスシステムの検討
研究成果 (呼吸器ウイルス研究小班)

RSV

- 9地衛研および感染症において計323株のRSVを分離・保存
- RSV分離株はいずれもヒトモノクローナル抗体に強く反応
- RSV感染重症化機構の解析を行いリスク要因を検討

hMPV

- 9地衛研および感染症において計222株のhMPVを分離・保存
- 遺伝子解析の結果 subgroup A2, B1およびB2のいずれかの subgroup に分類

RV

- 9地衛研および感染症において計212株のRVを分離・保存
- 我が国のRV type A 流行株は遺伝学的に11のクラスターに分類
- 遺伝子検索の結果RV type Cの流行を確認

PIV

- 9地衛研および感染症において計384株のPIVを分離・保存
- 我が国のPIV type 3は遺伝学的に3つのクラスターに分類

BoCV

- 5地衛研および感染症において計25株のBoCVを検出・保存

厚生労働科学研究費補助金 インフルエンザ等新規・再興感染症研究事業
ウイルス感染症の効果的制御のための病原体サーベイランスシステムの検討
技術の確立・普及および啓発 (呼吸器ウイルス研究小班)

1. 病原体検出マニュアルの作成と公開 計5編

RSウイルス編
ヒトメタニューモウイルス編
ライノウイルス編
パラインフルエンザウイルス編
ボカウイルス編

2. 各種ウイルス研修・新興再興感染症研修等における
検査技術の普及と実技実習の実施

2. 地域における啓発として各自治体におけるウイルス感染症
に関する啓発講演・研修等の実施

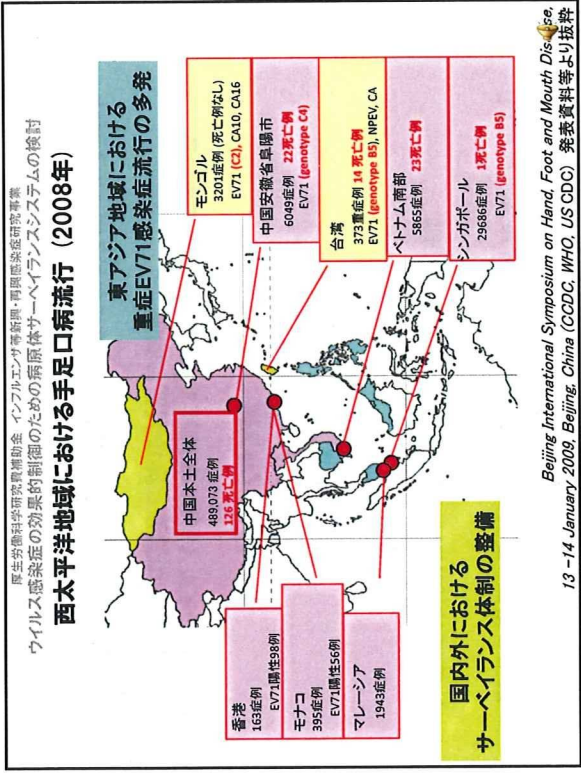
厚生労働科学研究費補助金 インフルエンザ等新規・再興感染症研究事業
ウイルス感染症の効果的制御のための病原体サーベイランスシステムの検討
おもな研究成果 (腸管ウイルス研究小班)

- ◆ AFPおよび補助的病原体サーベイランスによる国内外のポリオリーの確認
- ◆ 地域内の腸管ウイルス伝播を監視するための環境水ウイルス調査
- ◆ 中国の研究機関との共同研究による環境水ウイルス調査
- ◆ 海外渡航者に由来するエンテロウイルスの病原体サーベイランス
- ◆ 重症エンテロウイルス感染症の発症・病原体サーベイランス
- ◆ ヒトレトロウイルス病原体サーベイランスのための基礎的検討
- ◆ 呼吸器疾患を対象としたエンテロウイルス病原体サーベイランス手法の検討・評価

- ◆ 野生株ポリオウイルス実験室に送付しWHO報告書 (Phase I) を作成・提出

- ◆ ポリオウイルス感染防御に重要なウイルスRNAセンサーの解析
- ◆ ICAM-1発現細胞におけるエンテロウイルス感受性の検討
- ◆ ウイルス感染症制御のためのRNAケノム抗体ライブラリーの開発
- ◆ アイチウイルス非構造タンパク質の機能解析
- ◆ マウスEV71感染モデルの開発
- ◆ 抗エンテロウイルス化合物の同定

- ◆ ヒト細胞に発現する複数のEV71機能的受容体の同定・機能解析



厚生労働科学研究費補助金 インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業
ウイルス感染症の効果的制御のための病原体サーベイランスシステムの検討
おもな研究成果 (腸管ウイルス研究小班)

構造および機能の異なる複数のEV71受容体の同定

nature medicine

Letter abstract
DOI: 10.1038/nm1811
Published online 17 May 2009 (in final form 19 May 2009)

感染症: エンテロウイルス71の腸管的受容体としてのヒトPヒレクチン糖タンパク質リガンド
Yoshio Nishimura¹, Masayasu Shimamura², Yoshio Tomita¹, Takahiko Watarai¹ & Hisayuki Nishimura¹

エンテロウイルス71 (EV71) は、最近の流行病でも多くの人口の発症原因となる病原体である。手足口病 (HFMD) のほか、脳脊髄膜炎や脳炎を引き起こすことが知られている。この病原体は、ヒトPヒレクチン糖タンパク質 (P-ICAM) と結合して細胞内へ侵入し、細胞内での複製を行う。P-ICAMは、細胞表面に存在する糖タンパク質であり、その構造と機能はよく知られていない。本研究では、P-ICAMの構造と機能を明らかにするために、EV71とP-ICAMの相互作用を解析し、異なる構造と機能を持つ複数の受容体を同定した。これらの受容体は、EV71の細胞内侵入に重要な役割を果たしていることが示された。本研究の結果は、EV71の感染制御に向けた新たな戦略の開発に貢献する可能性がある。

NEWS AND VIEWS
Receptors identified for hand, foot and mouth virus
Receptors have now been identified for the virus behind severe hand, foot and mouth disease (pages 784-787)
Susmita P. Ghosh & Jeffrey M. Klenning

厚生労働科学研究費補助金 インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業
ウイルス感染症の効果的制御のための病原体サーベイランスシステムの検討
おもな研究成果 (腸管ウイルス研究小班)

複数の宿主受容体を介したEV71感染メカニズムの解明

Cells expressing little or no PSGL-1

特異的EV71受容体の同定とその応用

- EV71の感染伝播・細胞/組織特異性・病原性発現における複数の宿主受容体機能の解析
- EV71感染症の重篤化因子の解析
- 受容体特異性に基づく新たなエンテロウイルス実験室診断系の開発
- EV71感染マウスモデルの樹立

厚生労働科学研究費補助金 インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業
ウイルス感染症の効果的制御のための病原体サーベイランスシステムの検討
おもな研究成果 (ガイドライン、マニュアル、WHO報告書、技術研修、技術研修、特許等)

- 病原体検出マニュアル「麻しん検査マニュアル (第二版)」
- 病原体検出マニュアル「RSウイルス検査マニュアル」
- 病原体検出マニュアル「メタニューモウイルス検査マニュアル」
- 病原体検出マニュアル「ライノウイルス検査マニュアル」
- 病原体検出マニュアル「パラインフルエンザウイルス検査マニュアル」
- 病原体検出マニュアル「ホカウイルス検査マニュアル」
- 麻しん教育啓発用DVD「はしかから身を守るために」
- Quality Assurance Report of Phase I Wild Poliovirus Laboratory Containment in Japan (WHO Report, 2008)
- Country Progress Report on Maintaining Polio-free Status (WHO Annual Report, 2007, 2008, 2009)
- 技術研修 (国立保健医療科学院 特別過程ウイルスコース)
- 技術研修 (JICA Laboratory Diagnosis Techniques for the Global Polio Eradication, 2007, 2008, 2009)
- エンテロウイルス感染症の診断薬および予防・治療用薬剤 (特願2008-330983)

平成 21 年度 新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業 成果概要

研究課題： 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

課題番号： H19-新興-一般-014

研究代表者： 武田直和 (1, 2 年目) 鈴木哲朗 (3 年目)

I. 研究の意義

- (1) C 型肝炎、E 型肝炎に対する予防法は未だ整備されていない。
- (2) 酵母発現 HBs 蛋白等をワクチンとする B 型肝炎も、抗体獲得率は必ずしも高くない。
- (3) ネイティブなウイルスと同様な形態と抗原性を有するウイルス抗原の産生は極めて困難である。

II. 研究の目的、期待される成果

- (1) HEV-LP (E 型肝炎ウイルス様粒子) に対する単クローン抗体、高度免疫血清を作製し、簡便かつ高精度の抗原抗体診断法を確立する。
- (2) HEV-LP の粘膜ワクチンとしての有効性を評価する。
- (3) HEV 細胞培養系を確立する。
- (4) 各遺伝子型 HBV 由来の VLP を利用して遺伝子型特異的な HBV 抗原診断法を開発する。
- (5) HCV 構造蛋白遺伝子の強制発現細胞系で HCV-LP を産生させ、新たな HCV 診断法を開発する。

III. 3 年間の研究成果

・研究代表者 (武田)

- (1) 3 つの HEV 遺伝子型 G1、G3、G4 で VLP を作製、精製した。
- (2) 抗体検出 ELISA、抗原検出 ELISA、HEV 遺伝子検出系を確立した。

・研究分担者/代表者 (鈴木)

- (1) HBV 遺伝子型 A、B 及び C 由来株についてヒト肝細胞で HBV-LP を産生させ精製した。遺伝子型特異的抗原検査法を樹立すべく、各 HBV-LP 抗体を作製中。
- (2) HEV-LP を使った E 型肝炎ワクチン開発を中国北京生物製品研究所と共同で開始した。
- (3) (当初計画には含まれていないが) 本研究班の解析技術を活用し、2008 年同定された新規ヒトポリオマウイルス MCV の VLP を作製し、抗 MCV 抗体測定系を確立した。関連疾患が明らかでない MCV の血清疫学解析が可能となった。

・研究分担者 (田中)

- (1) HEV-LP に対する単クローン抗体、高度免疫血清を作製。イムノブロットによる臨床検体診断法を確立。
- (2) イムノクロマトによる HEV 簡易検査法の構築を目指し、エピトープの異なる多種 HEV 抗体を作製中。
- (3) HEV 保有疫学実態調査にて汚染地域を把握し、同地域での野生イノシシ猟師への感染予防 (生レバターの喫食など) に啓発した。
- (4) 汚染地域の把握から野生イノシシの HEV 感染には、感受性等に関与する特別な遺伝的背景の関与が推定されたが、養豚場からの交雑種 (イノブタ) の要素は見られなかった。

・研究分担者 (恒光)

- (1) ノトバイオート豚を用いた HEV 感染モデルで、HEV の感受性は日齢により異なることを示した。
- (2) 同感染モデルを用いて HEV-LP の経口・経鼻免疫を行い、感染防御に必要な投与条件を決定した。HEV-LP の 1 回経鼻投与においても感染阻止効果が確認された。

・研究分担者 (李)

- (1) ヒト肝癌細胞株 PLC/PRF/5 を用いて HEV 感染増殖細胞系を確立した。この培養系で、HEV の熱、塩素、紫外線等に対する安定性、抵抗性を明らかにした。HEV の不活化法を見出した。
- (2) よりネイティブな HEV 粒子構造に近似した T=3 HEV-LP の作製に成功した。ORF2 の N 末端 111 アミノ酸領域に同 VLP 形成決定基が存在した。この残基は粒子構造だけでなく、核酸パッケージングにも重要であることが示唆された。

・研究分担者 (勝二)

- (1) HBV-LP の遺伝子型間のキメラ粒子の解析より、pre S1 領域が粒子分泌効率に関与していることを見出した。同領域に型間で見られる 8 アミノ酸の多様性が分泌効率を左右する可能性が示唆された。
- (2) HCV J6/JFH1 株の継代培養により、従来より 10-100 倍感染価の高い HCV 産生系の樹立に成功した。

C型肝炎患者血清中の中和抗体価測定系を樹立した。

・研究分担者(石井)

- (1) ヒト肝癌由来細胞を用いて、サブゲノム遺伝子を内包した HCV-LP を恒常的に産生する系を確立し、培養上清からの HCV-LP 調製法を確立した。
- (2) HCV-LP 形成にウイルス NS2 領域が重要であることを証明した。
- (3) 中空粒子中に外来遺伝子を包埋し、感染細胞で目的遺伝子を発現させることに成功した。
- (4) 3種類のプラスミドトランスフェクションにより、感染性粒子を産生させる系の確立に成功した。

IV. 今後考えられる新たな課題

- (1) ワクチン実用化へ向けた HEV-LP の生産性、精製技術の最適化。安全性の確保。免疫誘導法の最適化。
- (2) 抗原診断系の開発へ向けた HCV-LP、遺伝子型別 HBV-LP の大量調製、特異抗体の選抜。

V. 行政施策への貢献の可能性

- (1) 免疫学的手法による HEV、HCV また遺伝子型別 HBV の迅速診断が期待できる。
- (2) VLP を利用した E 型肝炎及び C 型肝炎ワクチン、また全遺伝子型 HBV に対応する次世代 B 型肝炎ワクチンの開発に道が拓かれる。
- (3) ウイルス肝炎の診断、予防対策に寄与し、保健、医療の向上、医療費の縮減に貢献することが期待される。

VI. 本研究の成果 (発表論文・ガイドライン・マニュアル等)

- Yamashita T, Mori Y, Miyazaki N, Cheng RH, Yoshimura M, Unno H, Shima R, Moriishi K, Tsukihara T, Li TC, Takeda N, Miyamura T, Matsuura Y. Biological and immunological characteristics of hepatitis E virus-like particles based on the crystal structure. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 106:12986-91 (2009).
- 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.* 24:599-604 (2009).
- Sugitani M, Sheikh A, Suzuki K, Kinukawa N, Moriyama M, Arakawa Y, Komiyama K, Li TC, Takeda N, Ishaque SM, Roy PK, Raihan AS, Hasan M. Sero-epidemiology of sporadic acute hepatitis in Bangladesh: high prevalences of infection with type-B, type-E and multiple types of hepatitis virus. *Ann Trop Med Parasitol.* 103: 343-50 (2009).
- 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.
- Li T.C., Suzuki Y., Ami Y., Tsunemitsu H., Miyamura T. and Takeda N. Mice are not susceptible to hepatitis E virus infection *J Vet Med Sci.* 2008 Dec;70(12):1359-62.
- Wang CY, Miyazaki N, Yamashita T, Higashiura A, Nakagawa A, Li T-C, Takeda N, Xing L, Hjalmarsson E, Friberg C, Liou DM, Sung YJ, Tsukihara T, Matsuura Y, Miyamura T, H. CR, Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of recombinant hepatitis E virus-like particle. *Acta. Crystallogr. Sect. Struct. Biol. Cryst. Commun.* 64: 318-322 (2008).
- Li T.C., Scotti P.D., Miyamura T. and Takeda N. Latent infection of a new alphanodavirus in an insect cell line. *J Virol.* 81: 10890-10896, 2007.
- 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).
- Masaki, T., Suzuki, R., Murakami, K., Aizaki, H., Ishii, K., Murayama, A., Date, T., Matsuura, Y., Miyamura, T., Wakita, T., Suzuki, T. Interaction of hepatitis C virus nonstructural protein 5A with core protein is critical for the production of infectious virus production. *J. Virol.* 82: 7964-7976 (2008).
- 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).
- 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: E6AP ubiquitin ligase mediates ubiquitylation and degradation of hepatitis C virus core protein. *J Virol* 81:1174-1185 (2007).
- 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* 81: 8030-8040 (2007).
- 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. *J Gen Virol*, 89, 1587-92 (2008).
- Murakami, K., Inoue, Y., Hmwe, S.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. *J Virol Methods*, 148, 174-181 (2008).
- Suzuki, T., Aizaki, H., Murakami, K., Shoji, I., and Wakita, T., Molecular biology of hepatitis C virus. *J Gastroenterol*, 42, 411-23 (2007).
- 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. Prevalence of antibody to hepatitis E virus among wild sika deer, *Cervus nippon*, in Japan. *Arch Virol*. 152:1375-1381 (2007).
- 恒光 裕. E型肝炎、人獣共通感染症、養賢堂 39-45 (2007).
- Y Yamashita, Y Ootsuka, R Kondo, M Oseto, M Doi, T Miyamoto, T Ueda, H Kondo, T Tanaka, T Wakita, K Katayama, N Takeda and Yomoichiro Oka. Molecular characterization of Sapovirus detected in a gastroenteritis as a wedding hall. *J. Med. Virol.* (in press).
- K Motomura, T Oka, M Yokoyama, H Nakamura, H Mori, H Ode, G S. Hansman, K Katayama, T Kanda, T Tanaka, N Takeda, H Sato. Identification of monomorphic and divergent haplotypes in the 2006-2007 norovirus GII/4 epidemic population by genomewide tracing of evolution history. *J. Virol.* 82: 11247-11262 (2008).
- N Ishiguro, Y Inoshima, K Suzuki, T Miyoshi and T Tanaka. Construction of three-year genetic profile of Japanese wild boars in Wakayama prefecture, to estimate gene flow from crossedbred Inobuta into boar populations. *Mammal Study* 33: 43-49 (2008)
- Ishii, K., Murakami, K., Hmwe, SS., Bin, Z., Li, J., Shirakura, M., Morikawa, K., Suzuki, R., Miyamura, T., Wakita, T., Suzuki, T. Trans-encapsidation of hepatitis C virus subgenomic replicon RNA with viral structure proteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 371: 446-450 (2008).
- 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. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 377: 747-751 (2008)
- Bungyoku Y, Shoji I, Makine T, Adachi T, Hayashida K, Nagano-Fujii M, Ide Y, Deng L, Hotta H. Efficient production of infectious hepatitis C virus with adaptive mutations in cultured hepatoma. *J. Gen. Virol.* 90: 1681-1691 (2009).
- Deng L, Adachi T, Kitayama K, Bungyoku Y, Kitazawa S, Ishido S, Shoji I, Hotta H. Hepatitis C virus infection induces apoptosis through a Bax-triggered, mitochondria-mediated, caspase-3-dependent pathway. *J. Virol*, 82:10375-10385 (2008).

VII. III (3年間の研究成果)の概要図等

<E型肝炎>

診断法：各遺伝子型 VLP を作製、精製。
Native-size VLP の作製。
抗 VLP 単クローン抗体の作製。
抗原抗体検出 ELISA の確立。
遺伝子検出系の確立。
疫学調査により汚染実態を把握。

ワクチン：豚感染モデルの作出。
経口、経鼻投与による感染防御を実証。
国際共同研究によるワクチン開発の実施。

培養系：肝癌細胞株で感染増殖系を樹立
感染性粒子の不活化法を策定

<C型肝炎>

高ウイルス産生系の樹立。
中和抗体価測定法の確立。
VLP 持続産生細胞株の作製、VLP の調製。
NS2 蛋白が粒子形成に重要。

<B型肝炎>

各遺伝子型由来 VLP を作製、精製。
粒子分泌効率を決定する残基の同定。

<実用化へ向けた課題>

ワクチン開発：
HEV-LP の生産性、精製技術の最適化。安全性の確保。
免疫誘導法の最適化。
抗原診断法開発：
HCV-LP、遺伝子型別 HBV-LP の大量調製。特異抗体の選抜。

○研究代表者の研究歴等

・過去に所属した研究機関の履歴

万有製薬探索研究所	研究員	昭和 58 年～平成 3 年
国立予防衛生研究所	研究員	平成 3 年～8 年
カリフォルニア工科大学	Research fellow	平成 5 年～8 年
国立感染症研究所	主任研究官	平成 7 年～12 年
同上	室長	平成 12 年～現在

・主な共同研究者(又は指導を受けた研究者)

万有製薬探索研究所	所長：岡西昌則
国立予防衛生研究所	部長：宮村達男, 室長：松浦善治
カリフォルニア工科大学	Professor：Alexander Varshavsky
国立感染症研究所	部長：脇田隆字

・主な研究課題

- C型肝炎ウイルス(HCV)の研究
 - HCV 蛋白プロセシング機構に関する研究
 - HCV コア蛋白の成熟化、粒子形成機構に関する研究
 - HCV 増殖細胞系の開発と複製調節機構に関する研究
 - HCV コア蛋白による病原性発現機構に関する研究
- B型肝炎ウイルス(HBV)の研究
 - HBV の RNA プロセシングに関する研究
 - ユビキチン化蛋白の選択的分解機構に関する研究
 - 細胞分化誘導物質による抗癌剤開発

これまでの研究実績

1. Involvement of creatine kinase B in hepatitis C virus genome replication through interaction with the viral NS4A protein. *J. Virol.* (2009).
2. Proteasomal turnover of hepatitis C virus core protein is regulated by two distinct mechanisms: ubiquitin-dependent and ubiquitin-independent but PA28gamma-dependent. *J. Virol.* (2009).
3. Interaction of hepatitis C virus nonstructural protein 5A with core protein is critical for the production of infectious virus production. *J. Virol.* 82: 7964-7976 (2008).
4. A Critical Role of Virion-Associated Cholesterol and Sphingolipid in Hepatitis C Virus Infection. *J. Virol.* (2008).
5. Down-regulation of the internal ribosome entry site (IRES)-mediated translation of the hepatitis C virus: critical role of binding of the stem-loop IIIId domain of IRES and the viral core protein. *Virology* (2006).
6. 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* (2006).
7. All-trans retinoic acid down-regulates human albumin gene expression through the induction of C/EBPbeta-LIP. *Biochem. J.* (2006).
8. Molecular determinants for subcellular localization of hepatitis C virus core protein. *J. Virol.* (2005).
9. Identification of basal promoter and enhancer elements in an untranslated region of the TT virus genome. *J. Virol.* 78: 10820-10824 (2004).
10. Anti-apoptotic regulation by hepatitis C virus core protein through up-regulation of inhibitor of caspase-activated DNase. *Virology* (2003).
11. CYP3A4 inducible model for in vitro analysis of human drug metabolism using a bioartificial liver. *Hepatology* (2003).
12. Production and release of infectious hepatitis C virus from human liver cell cultures in the three-dimensional radial-flow bioreactor. *Virology* (2003).
13. Hepatitis C virus core protein activates ERK and p38 MAPK in cooperation with ethanol in transgenic mice. *Hepatology* (2003).
14. Expression profiling of liver cell lines expressing entire or parts of hepatitis C virus open reading frame. *Hepatology* (2002).
15. Ubiquitin-mediated degradation of hepatitis C virus core protein is regulated by processing at its carboxyl terminus. *Virology* (2001).
16. Degradation signals in the lysine-asparagine sequence space. *EMBO J.* (1999).
17. In vivo and in vitro trans-cleavage activity of hepatitis C virus serine proteinase expressed by recombinant baculoviruses. *J. Gen. Virol.* (1995).
18. Expression of processed core protein of hepatitis C virus in mammalian cells. *J. Virol.* (1991).
19. Alternative splicing of hepatitis B virus RNAs in HepG2 cells transfected with the viral DNA. *Virology* (1990).
20. Detection and mapping of spliced RNA from a human hepatoma cell line transfected with the hepatitis B virus genome. *Proc. Nat. Acad. Sci., U.S.A.* (1989).
21. 感染性 C 型肝炎ウイルス粒子高産生系 PCT/2006/JP319572
22. 新規 RNA 結合ペプチド PCT/JP2006/320991
23. C 型肝炎ウイルス粒子及びその増殖法 PCT/JP2006/304223

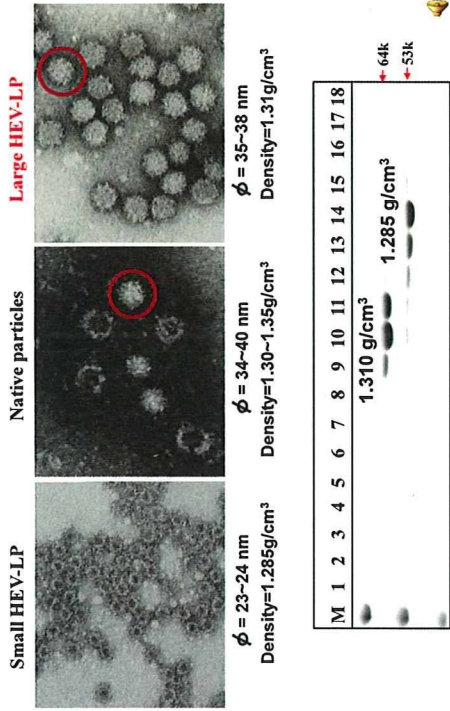
中空粒子を用いたウイルス性肝炎の 新しい検査・予防法の開発 (H19-新興一般-014)

研究代表者
(1,2年目) 武田直和
(3年目) 鈴木哲朗



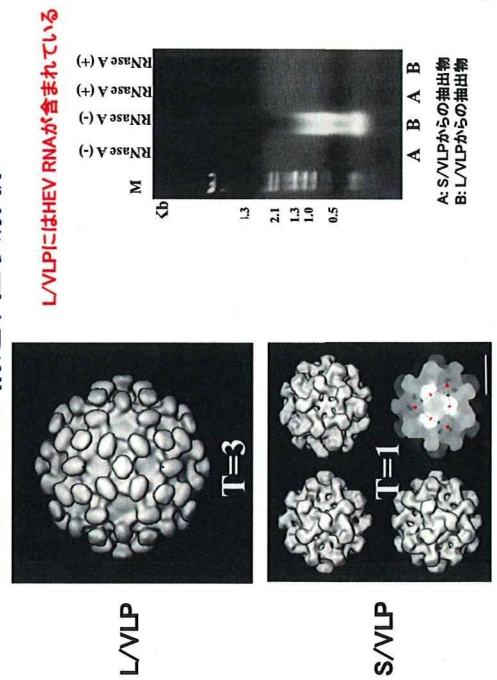
E型肝炎ウイルス

ネイティブ粒子様HEV-LP (L/HEV-LP)の作製



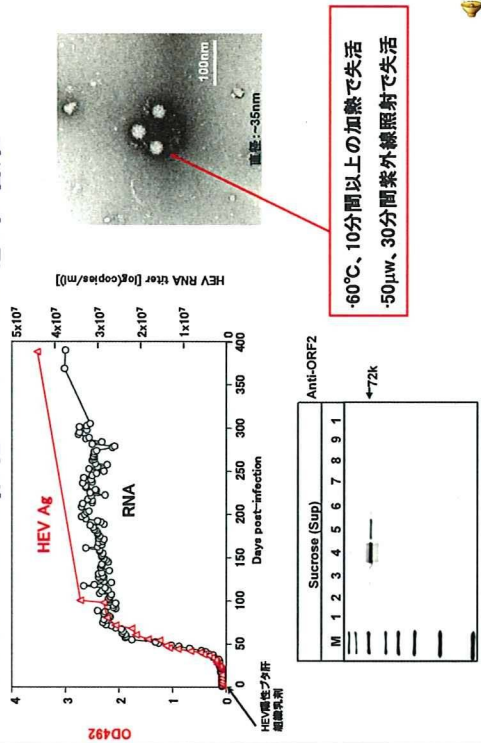
E型肝炎ウイルス

L/HEV-LPの構造、性状解析



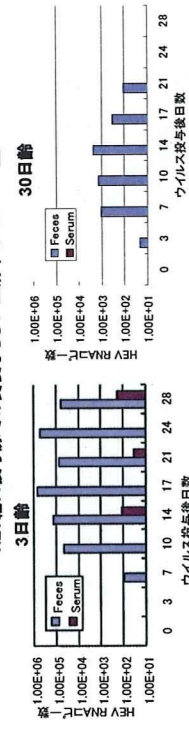
E型肝炎ウイルス

PLC/PRF/5細胞でのHEVの感染増殖

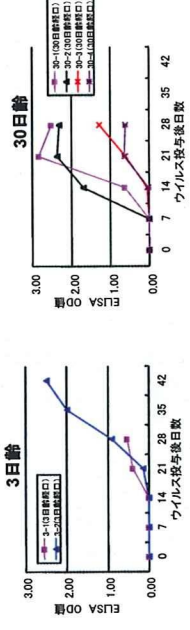


豚へのHEV感染の日齢感受性

HEV経口投与豚での糞便ならびに血清中のHEV RNA量

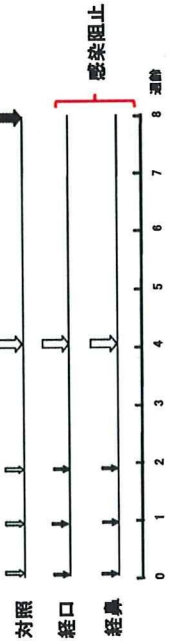


HEV投与後の血清中IgG抗HEV抗体の推移



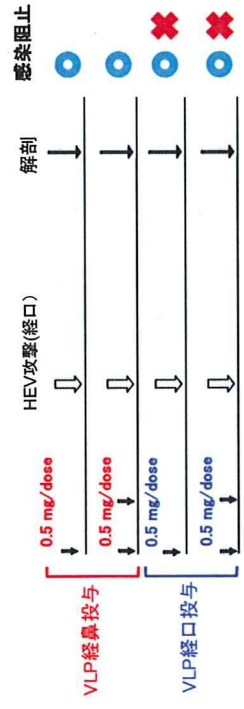
HEV経口感染における感受性は日齢が進むにつれて低下する。
若齢(3日齢)の方が抗HEV IgG抗体は誘導されにくい。

VLP投与によるHEV感染防御-1



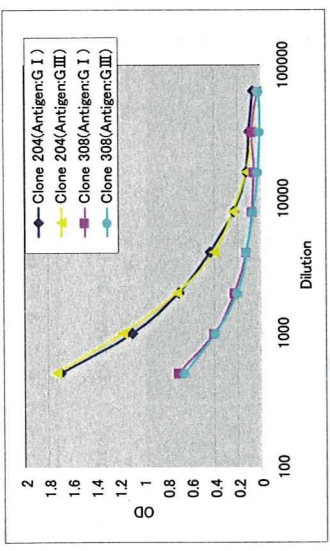
HEV VLPを1週間隔で3回投与した時の最小感染阻止量
経口でも経鼻でも0.5 mg/dose

VLP投与によるHEV感染防御-2



今後の展開
 ✓ SPF豚生産への利用
 ✓ HEVワクチン実用化(国際共同研究)

HEV遺伝子型間で交叉反応を示す単クローン抗体の作製



使用抗原: HEV-VLPs (Genotype III)

- ✓ エピトープ解析
- ✓ 遺伝子型共通HEV検出法の開発

E型肝炎ウイルス 野生イノシシ、シカにおけるHEV保有実態調査 : 大阪府南部〜和歌山県



調査検体数と抗HEV IgG抗体・HEV RNA陽性数

Sample ID	A 地区		B 地区		C 地区	
	イノシシ	シカ	イノシシ	シカ	イノシシ	シカ
H-15	4(1)*1	-	3(0)	-	2(0)	2(0)
H-16	17(1)*1	-	2(0)	1(0)	-	-
H-17	17(0)	-	9(0)	3(0)	10(0)	11(0)
H-18	7(0)	-	21(0)	12(0)	4(0)	6(0)
H-19	3(1)*1	-	-	-	-	-
H-20	28(12)*2	-	-	-	-	-
H-21	23(0)	-	-	-	-	-

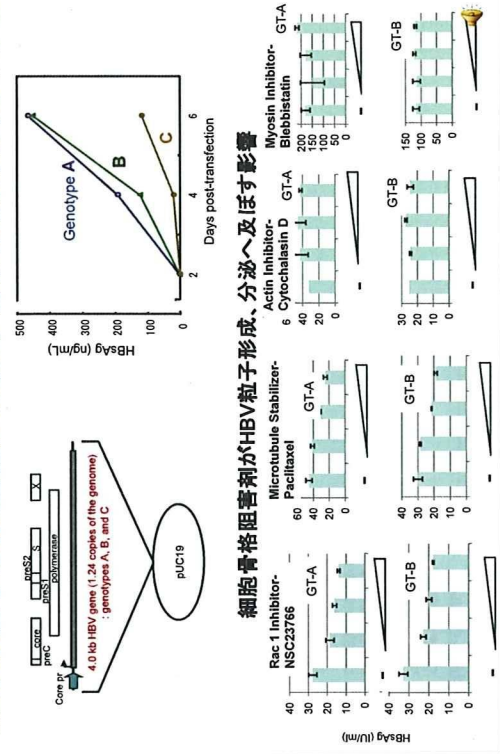
検体数(IgG抗体陽性数)・HEV遺伝子陽性

HEV感染イノシシにおけるウイルスRNAレベルと抗IgG抗体

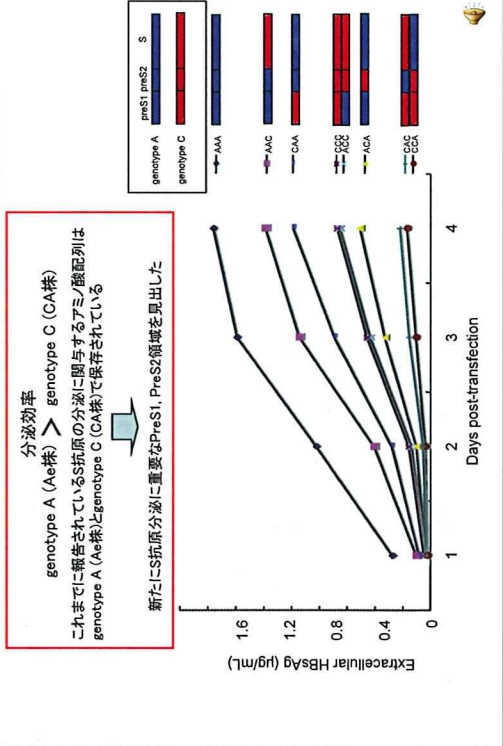
Sample ID	肝臓		血液		抗HEV IgG
	HEV RNA (copies/g)	抗HEV IgG	HEV RNA (copies/ml)	抗HEV IgG	
H15-9L	4.75E+07	2.18E+05	2.18E+05	0.374	
H16A5L	2.20E+08	1.18E+05	1.18E+05	2.416	
H19A3L	6.15E+08	9.85E+03	9.85E+03	0.203	
H19A8L	4.54E+07	3.89E+04	3.89E+04	0.859	
H19A3/L	3.82E+07	3.07E+04	3.07E+04	2.402	

A地区ではH17に2名の急性E型肝炎患者の発生があった。
人への感染源として野生動物の実態調査の意味がある。

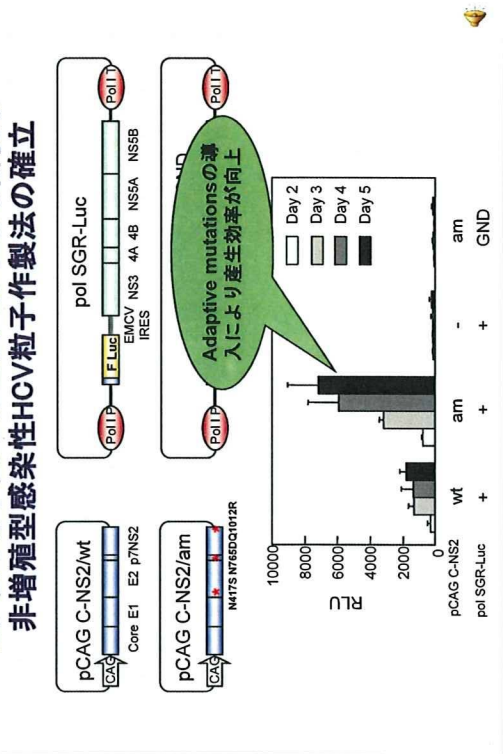
B型肝炎ウイルス HBVの粒子形成過程には微小管形成調節が関与する



B型肝炎ウイルス HBV粒子分泌に重要なPreS領域の同定

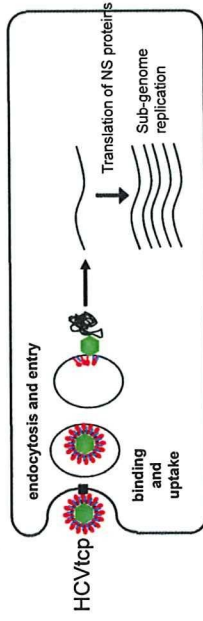


C型肝炎ウイルス 2プラスミドトランスフェクションによる簡便な非増殖型感染性HCV粒子作製法の確立

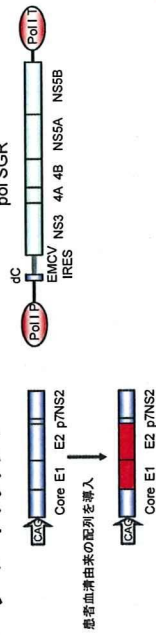


非増殖型感染性HCV粒子のワクチン開発への応用

・CTL誘導ワクチン

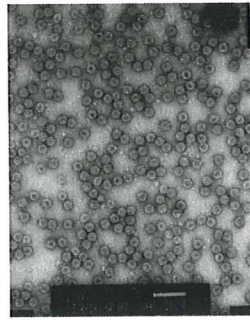
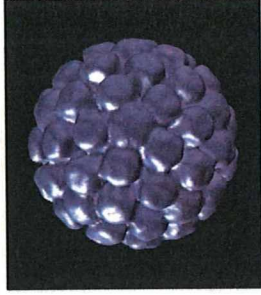


・テーラーメイドワクチン?



ヒトポリオーマウイルスMCVのVLP作製と粒子構造解析

ウイルス	ゲノムサイズ(bp)	関連疾患	文献
BK virus	5130	腎移植後腎症、出血性膀胱炎	Gardner et al. (Lancet 1971)
JC virus	5133	進行性多巣性白質脳症 (PML)	Padgett et al. (Lancet 1971)
KI virus	5040	?	Allander et al. (J Virol 2007)
WU virus	5229	?	Ganor et al. (PLoS Path 2007)
MC virus	5418	メルケル細胞がん	Feng et al. (Science 2008)



直径: ~50 nm, 密度: ~1.32 g/cm³

我が国健康者における抗MCV抗体の保有率

<検査対象> 血清銀行保存血清: 1~70歳の男女(北海道/東北、関東、九州)計1050検体

Ages	MCV		BKV		JCV	
	Male	Female	Male	Female	Male	Female
1-5	11	14	45	47	24	17
6-10	18	28	79	85	23	15
11-15	43	32	81	92	30	35
16-20	42	45	68	74	42	45
21-25	46	29	69	79	35	41
26-30	50	62	74	69	41	31
31-35	33	35	75	73	53	60
36-40	50	40	65	55	50	60
41-45	43	46	47	83	63	54
46-50	43	64	47	75	70	58
51-55	50	36	60	58	53	61
56-60	57	57	67	74	67	67
61-65	49	45	59	78	63	65
66-70	55	59	63	66	78	69
Ave.	42.5%	43.0%	64.5%	72.4%	52.0%	49.9%
Total ave.	42.8%		68.4%		51.0%	

今後の課題

E型肝炎ウイルス

- ワクチン開発**
G1, G3, G4のVLPを作製した
ブタ感染モデルへのVLP投与による感染防御を裏証した
- 診断技術の開発**
G1, G3 HEVIに交差反応する単クローン抗体を作製した
- ウイルス学的解析**
感染増殖細胞系を樹立し、感染性粒子の生存性を示した
ブタでの日齢感受性を明らかにした
ナイテアブHEV様粒子の作製に成功した
- 血清疫学解析**
野生ニホンジカ、シカにおける感染状態を明らかにした

B型肝炎ウイルス/C型肝炎ウイルス

- HBV**
精子分泌に寄与するPreS領域を同定した
精子形成、分泌における細胞骨格の役割を示した
- HCV**
効果のよい非増殖型感染性粒子作製法を確立した
新たな増殖適応変異を同定した

新規ポリオーマウイルスMCV

- VLPを作製、精製し、抗体検査法を確立した
我が国健康者における抗体保有状況を明らかにした
- ワクチン、診断法開発への応用
- 粒子構造の解析
関連疾患の解明

平成 21 年度 新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業 成果概要

研究課題：経鼻粘膜投与型インフルエンザワクチンの臨床応用に関する研究課題番号：H19-新興-一般-015研究代表者：長谷川 秀樹**I. 研究の意義**

- (1) インフルエンザの流行に対する現行の注射型ワクチンは感染後の重症化を抑えるが感染を防御する事ができない。経鼻ワクチンの臨床応用により感染を防御するワクチンの実用化に繋がる。
- (2) 現在インフルエンザワクチンに用いるウイルス株は流行予測に基づいて決定されている。流行株が予測通りではない場合注射型ワクチンでは効果が低い。交叉防御能の高い経鼻ワクチンの臨床応用により流行株がワクチン株と異なる場合にも有効性の高いワクチンの実用化に繋がる。
- (3) 流行予測の不可能な新型インフルエンザウイルスに対して交叉防御能の高い経鼻ワクチンはプレパンデミックワクチンとして有効性が高い。

II. 研究の目的、期待される成果

- (1) 経鼻粘膜投与型インフルエンザワクチンの臨床応用を目的とする。
- (2) 経鼻粘膜投与型インフルエンザワクチンの製剤の決定、安定性、安全性、有効性等を調べ GLP 施設における全臨床試験を終了しヒトでの第 1 相臨床治験を目指す。
- (3) 経鼻粘膜投与型インフルエンザワクチンの臨床応用の為の基礎的データの集積、最適な剤形の決定、ヒトでの治験に向けた前臨床試験の終了が期待される。

III. 3 年間の研究成果

・研究代表者

- (1) ヒトで安全性が確認されている合成二本鎖 RNA polyI:polyC₁₂U (Ampligen) を新規アジュバントに用いた経鼻ワクチンでワクチン株と同じ株の A/Vietnam/1194/2004 (H5N1) 株の感染防御だけでなく抗原性の異なる A/HK/483/97(H5N1)、A/Indonesia/6/2005(H5N1)ウイルスの攻撃感染に対しほぼ完全に感染を阻止する事を示した。
- (2) 高病原性鳥インフルエンザウイルス A/Vietnam/1194/2004 (H5N1) 由来 NIBRG14 の不活化全粒子ワクチンを用いカニクイザルでの免疫応答、感染防御能力、更に攻撃感染後の病理学的解析を行った。感染自身を防御する効果が高い事が示され更にワクチン接種によると思われる副作用は認められなかった。

・研究分担者(真鍋貞夫)

- (1) 二本鎖 RNA (dsRNA) であるをアジュバントとしたインフルエンザ HA ワクチンを試作してマウスでの効果を確認した。また医薬品としての開発が進行し、安全性や応用の点で実用化に近い dsRNA である Ampligen®[Poly (I:C₁₂U)] をアジュバントとして同様の試験を実施した。Ampligen のを用いた時の免疫応答増強のレベルは Poly (I:C) と同等である事を証明した。
- (2) また、Ampligen とともに、ワクチンの鼻粘膜への定着性を向上させる添加剤として、カルボキシビニルポリマー基剤(CVP) [0.55% カルボキシビニルポリマー]を併用した試作ワクチンを作製した。この Ampligen・CVP 基剤併用ワクチンは、マウス経鼻接種試験において、Ampligen 単独よりも高い免疫応答増進効果を得た。
- (3) アジュバント候補である Poly (I:C) と Ampligen については、GLP 試験として SD ラットとビーグル犬を用いた単回(皮下又は経鼻)・反復(経鼻)毒性試験を行った。設定した用法・用量はヒトで想定される数倍～100 倍程度にあたるが、Poly (I:C) または Ampligen に起因すると見られる毒性変化は見られなかった。
- (4) 試作ワクチンの前臨床試験を GLP 施設で実施
アジュバント単独、及び BK-NIF の GLP 試験、Ampligen+CVP 添加ワクチンの用量・投与回数確認試験、Ampligen の性状解析および安定性調査を行い前臨床試験として安定性、安全性を確認した。

・研究分担者(喜田 宏)

- (1) 様々なインフルエンザウイルスを分離及び実験室で作出し、16 の HA 亜型と 9 の NA 亜型の組み合わせ 144 通り全てのウイルスをワクチンおよび診断に利用できるウイルス株として系統保存した。
- (2) 北海道で分離された H7 亜型のワクチン候補株 A/duck/Hokkaido/Vac-2/2004 (H7N7) の全遺伝子配列を決定し、遺伝子情報をデータベースに登録し更にこの株が H7 インフルエンザに対するワクチン株として有用であることを確認した。
- (3) 2008 年北海道の野生オオハクチョウの斃死体から分離された A/whooper swan/Hokkaido/1/2008 (H5N1) の抗原性を解析した結果、昨年樹立した H5 亜型ワクチン候補株とは、抗原性を異にする事がわかった。

・研究分担者 (田代真人)

- (1) WHO に協力して、世界各地で流行している H5N1 型高病原性鳥インフルエンザウイルスの抗原解析、遺伝子解析を行い、H5N1 ワクチン製造用のプロトタイプワクチン株を選定した。
- (2) 現在までに世界各地で開発され、臨床試験が実施されている H5N1 型ワクチンについて、その臨床試験成績を比較検討し、新型インフルエンザに対するワクチンとしては、弱毒化生ワクチンよりは、アジュバント添加不活化経鼻投与ワクチンの期待が大きいと判断された。
- (3) H5N1 ウイルスに対する抗体測定法の検討を行った。

・研究分担者 (清野研一郎)

NKT 細胞を活性化する α -galactosylceramide (α -GalCer) をアジュバントとした経鼻インフルエンザワクチンの有効性、安全性を明らかにした。

IV. 今後考えられる新たな課題

- (1) 高病原性鳥インフルエンザ H5N1 に対する経鼻ワクチンの臨床治験の確実な実施と臨床応用。
- (2) 季節性インフルエンザでの経鼻インフルエンザワクチンの交叉防御能のヒトでの検討。
- (3) 経鼻インフルエンザワクチンによる交叉防御能のメカニズムの解明。
- (4) 新型インフルエンザウイルスに対する経鼻インフルエンザワクチンの臨床応用。

V. 行政施策への貢献の可能性

- (1) 2008年4月改正の感染症予防法附帯決議にあるワクチンの経鼻粘膜投与技術の開発等を推進する為に貢献する研究結果である。
- (2) 得られた研究結果はより効果の高い将来のインフルエンザワクチン接種方法の決定に大きく寄与すると考えられる。
- (3) インフルエンザに限らず粘膜を介して感染する感染症のワクチン方法としての応用が考えられる。

VI. 本研究の成果(発表論文・ガイドライン・マニュアル等)

(1)長谷川秀樹 (研究代表者)

1. Hasegawa H*, Ichinohe T, Tamura S, Kurata T. Development of a mucosal vaccine for influenza viruses: preparation for a potential influenza pandemic. *Expert Review of Vaccines*, April 2007, Vol. 6, No. 2, Pages 193-201.
2. Ichinohe T, Nagata N, Strong P, Tamura SI, Takahashi H, Ninomiya A, Imai M, Odagiri T, Tashiro M, Sawa H, Chiba J, Kurata T, Sata T, Hasegawa H*. Prophylactic effects of chitin microparticles (CMP) on highly pathogenic H5N1 influenza virus. *J Med Virol*. 2007 Jun;79(6):811-819.
3. Ichinohe T, Kawaguchi A, Tamura S, Ninomiya A, Imai M, Itamura S, Odagiri T, Tashiro M, Chiba J, Sata T, Kurata T and Hasegawa H*. Intranasal immunization with H5N1 vaccine plus Poly I:Poly C12U, a Toll-like receptor agonist, protects mice against homologous and heterologous virus challenge. *Microbes and Infection* 2007 Sep;9(11):1333-40. 2007 Jul 1; [Epub ahead of print]
4. Ichinohe T, Tamura S, Kawaguchi A, Ninomiya A, Imai M, Itamura S, Odagiri T, Tashiro M, Takahashi H, Sawa H, Mitchell WM, Strayer DR, Carter WA, Chiba J, Kurata T, Sata T, Hasegawa H*. Cross-protection against H5N1 influenza virus infection afforded by intranasal administration of seasonal trivalent inactivated influenza vaccine. *J Infect Dis*. 2007 Nov 1;196(9):1313-20. Epub 2007 Oct 5.
5. Kamijuku H, Nagata Y, Jiang X, Ichinohe T, Tashiro T, Mori K, Taniguchi M, Hase K, Ohno H, Shimaoka T, Yonehara S, Odagiri T, Tashiro M, Sata T, Hasegawa H*, Seino KI. Mechanism of NKT cell activation by intranasal coadministration of -galactosylceramide, which can induce cross-protection against influenza viruses *Mucosal Immunol*. 2008 May;1(3):208-18. Epub 2008 Mar 5.
6. Ichinohe T, Iwasaki A, Hasegawa H. Innate sensors of influenza virus: clues to developing better intranasal vaccines. *Expert Rev Vaccines*. 2008 Nov;7(9):1435-45.
7. Takahashi Y, Hasegawa H, Hara Y, Ato M, Ninomiya A, Takagi H, Odagiri T, Sata T, Tashiro M, Kobayashi K. Protective immunity afforded by H5N1 (NIBRG-14)-inactivated vaccine requires both

- antibodies against hemagglutinin and neuraminidase in mice. *J Infect Dis.* 2009 Jun 1;199(11):1629-37.
8. Hasegawa H, Ichinohe T, Ainai A, Tamura S, Kurata T. Development of an inactivated mucosal vaccine for H5N1 influenza virus. *Ther Clin Risk Manag.* 2009 Feb;5(1):125-32.
 9. Takahashi H, Ohtaki N, Maeda-Sato M, Tanaka M, Tanaka K, Sawa H, Ishikawa T, Takamizawa A, Takasaki T, Hasegawa H, Sata T, Hall WW, Kurata T, Kojima A. Effects of the number of amino acid residues in the signal segment upstream or downstream of the NS2B-3 cleavage site on production and secretion of prM/M-E virus-like particles of West Nile virus. *Microbes Infect.* 2009 Aug 6. [Epub ahead of print]
 10. Ichinohe T, Ainai A, Tashiro M, Sata T, Hasegawa H PolyI:polyC12U adjuvant-combined intranasal vaccine protects mice against highly pathogenic H5N1 influenza virus variants. *Vaccine* 2009 Oct 23;27(45):6276-9.
 11. Ichinohe T, Ainai A, Nakamura T, Akiyama Y, Maeyama J, Odagiri T, Tashiro M, Takahashi H, Sawa H, Tamura S, Chiba J, Kurata T, Sata T, and Hasegawa H. Induction of cross-protective immunity against influenza A virus H5N1 by intranasal vaccine with extracts of mushroom mycelia. *J Med Virol.* 82:128-137, 2010.
 12. Ainai A, Ichinohe T, Tamura S, Kurata T, Sata T, Tashiro M and Hasegawa H Zymosan enhances the mucosal adjuvant activity of Poly(I:C) in a nasal influenza vaccine. *J Med Virol.* In press

田代真人 (研究分担者)

1. Shirato, K., Nishimura, H., Saijo, M., Okamoto, M., Noda, M., Tashiro, M., Taguchi, F. Diagnosis of human respiratory syncytial virus infection using reverse transcriptase loop-mediated isothermal amplification. *J. Virol. Methods* 139: 78-84, 2007.
2. Okada, M., Okuno, Y., Hashimoto, S., Kita, Y, Kanamaru, N., Nishida, Y., Tsunai, Y., Inoue, R., Nakatani, H., Fukamizu, R., Namie, N., Yamada, J., Takao, K., Asai, A., Asaki, R., Kase, T., Takemoto, Y., Yoshida, S., Peiris, J.S.M., Chen, P.-J., Yamamoto, N., Nomura, N., Ishida, I., Morikawa, S., Tashiro, M., Sakatani, M. Development of vaccines and passive immunotherapy against SARS corona virus using SCID-PBL/hu mouse models. *Vaccine* 25: 3038-3040, 2007.
3. Ninomiya, A., Imai, M., Tashiro, M., Odagiri, T. Inactivated influenza H5N1 whole-virus vaccine with aluminum adjuvant induces homologous and heterologous protective immunities against lethal challenge with highly pathogenic H5N1 avian influenza viruses in a mouse model. *Vaccine* 25; 3554-3560, 2007.
4. Kato, A., Kiyotani, K., Kubota, T., Yoshida T., Tashiro, M., Nagai, Y. Importance of anti-Interferon capacity of the Sendai virus C protein for pathogenicity in mice. *J. Virol.* 81: 3264-3271, 2007.
5. Imai, M., Ninomiya, A., Minekawa, H., Nomoto, T., Ishizaki, T., Tu, P.-V., Tien, N. T. K., Tashiro, M., Odagiri, T. :Rapid diagnosis of H5N1 avian influenza virus infection by newly developed influenza H5 hemagglutinin gene-specific loop-mediated isothermal amplification method. *J. Virol. Methods* 141: 173-180, 2007.
6. Fujii, K., Kakumoto, C., Kobayashi, M., Saito, S., Kariya, T., Watanabe, Y., Sakoda, Y., Kida, H., Suzuki, M. Serological evidence of influenza A virus infection in Kuril harbor seals (*Phoca vitulina stejnegeri*) of Hokkaido, Japan. *J Vet Med Sci* 69: 259-263, 2007.

7. Russell, C. A., Jones, T. C., Barr, I. G., Cox, N. J., Gregory, V., Gust, I. D., Hampson, A. W., Hay, A. J., Hurt, A. C., de Jong, J. C., Kelso, A., Klimov, A. I., Kageyama, T., Komadina, N., Lapedes, A. S., Lin, Y. P., Mosterin, A., Obuchi, M., Odagiri, T., Osterhaus, A. D.M.E., Rimmelzwaan, G. F., Shaw, M. W., Skepner, E., Stohr, K., Tashiro, M., Fouchier, R. A.M., Smith, D. J. The global circulation of seasonal influenza A(H3N2) viruses. *Science* 320: 340-346, 2008.
8. Ogata, T., Yamazaki, Y., Okabe, N., Nakamura, Y., Tashiro, M., Nagata, N., Itamura, S., Yasui, Y., Nakashima, K., Doi, M., Izumi, Y., Fujieda, T., Yamato, S., Kawada, Y. H5N2 influenza infection to human in Japan and association of seasonal influenza vaccination with positive H5N2 neutralizing antibody. *J. Epidemiol.* 18: 160-166, 2008.
9. Kubota, T., Matuoka, M., Chang, T.-H., Taylor, P., Sasaki, T., Tashiro, M., Kato, A., Ozato, K. Virus infection triggers SUMOylation of IRF3 and IRF7, leading to the negative regulation of type 1 interferon gene expression. *J. Biol. Chem.* 283: 25660-25670, 2008.
10. Russell, C. A., Jones, T. C., Barr, I. G., Cox, N. J., Gregory, V., Gust, I. D., Hampson, A. W., Hay, A. J., Hurt, A. C., de Jong, J. C., Kelso, A., Klimov, A. I., Kageyama, T., Komadina, N., Lapedes, A. S., Lin, Y. P., Mosterin, A., Obuchi, M., Odagiri, T., Osterhaus, A. D.M.E., Rimmelzwaan, G. F., Shaw, M. W., Skepner, E., Stohr, K., Tashiro, M., Fouchier, R. A.M., Smith, D. J. Influenza vaccine strain selection and recent studies on the global migration of seasonal influenza viruses. *Vaccine* 26: 31-34, 2008.
11. Makizumi, K., Kimachi, K., Fukada, K., Nishimura, T., Kudo, Y., Goto, S., Odagiri, T., Tashiro, M., Kino, Y. Timely production of A/Fujian-like influenza vaccine matching the 2003–2004 epidemic strain may have been possible using Madin–Darby canine kidney cells. *Vaccine*, 26: 6852-6858, 2008.
12. Nicoll, A., Mori, K., Tashiro, M. Winston Churchill and the Russian Pandemic of 1890-91. *Br. Med. J.* 337: 2890, 2008.
13. Kawakami, C., Obuchi, M., Saikusa, M., Noguchi, Y., Ujike, M., Odagiri, T., Tashiro, M. Outbreaks of oseltamivir-resistant influenza A/H1N1 virus in an elementary school and a family in Yokohama City, Japan during the 2007-2008 season. *Jpn. J. Infect. Dis.* 62: 83-86, 2009.
14. Wada, T., Morishima, T., Okumura, A., Tashiro, M., Hosoya, M., Shiomi, M., Okuno, Y. Differences by age in clinical manifestations of influenza-associated encephalopathy. *Microbiol. Immunol.* (2009 in press)
15. Ikeno, D., Kimachi, K., Kudo, Y., Goto, S., Itamura, S., Odagiri, T., Tashiro, M., Kino, Y. The prime-boost vaccination of H5N1 heterologous strains in a mouse model. *Vaccine* (2009 in press)
16. Akiyama, M., Kimura, H., Tsukagoshi, H., Taira, K., Mizuta, K., Saitoh, M., Nagano, M., Sutoh, A., Noda, M., Morita, Y., Sakatsume, O., Okabe, N., Tashiro, M. Development of assay for the detection and quantitation of measles virus nucleoprotein (N) gene using real-time reverse transcription polymerase chain reaction (real-time RT-PCR). *J. Med. Microbiol.* (2009 in press)
17. Thongratsaku, S., Songserm, T., Poolkhet, C., Kondo, S., Yagi, H., Hiramatsu, H., Tashiro, M., Kato, K., Suzuki, Y. Determination of N-linked sialyl-sugar chains in the lungs of domestic cats and dogs in Thailand susceptible to the highly pathogenic avian influenza virus (H5N1). *Biochem. J* (2009)
18. Tashiro, M., McKimm-Breschkin, J., Saito, T., Klimov, A., Macken, C., Zambon, M., Hayden, F. Surveillance for Neuraminidase Inhibitor-Resistant Influenza Viruses in Japan, 1996-2007. *Antiviral*