

- 7) 岸田修二. HAART 療法導入後の HIV 関連 PML6 自験例の臨床的検討. 神経内科 69: 568-576, 2008
- 8) Garcia-Suarez, et al. Changes in the natural history of progressive multifocal leukoencephalopathy in HIV-negative lymphoproliferative disorders: impact of novel therapies. Am J Hematol 80: 271-281, 2005
- 9) Elphick GF, et al. The human polyomavirus, JCV, uses serotonin receptors to infect cells. Science 306: 1380-1389, 2004
- 10) Aksamit AJ: Progressive multifocal leukoencephalopathy. Curr Treat Options Neurol 10: 178-185, 2008

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 岸田修二. 進行性多巣性白質脳症. Clin Neurosci. 27: 1276-1278, 2009
- 2) 岸田修二. 進行性多巣性白質脳症. 化学

療法の領域 25: 1289-1295, 2009

- 3) 岸田修二. 進行性多巣性白質脳症. Clin Neurosci. 28: 2010. 印刷中

2. 学会発表

- 1) 田中こずえ, 岸田修二. 血液疾患治療中に発症した PML6 例の検討. 第 14 回日本神経感染症学会総会, 宇都宮, 2009.10
- 3) 稲垣里奈, 柳沢如樹, 菅沼明彦, 今村顕史, 味澤 篤, 岸田修二. HAART 導入後に免疫再構築症候群として進行性多巣性白質脳症の増悪が疑われ、脳生検を施行した一例. 第 23 回日本エイズ学会総会, 名古屋, 2009.11

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

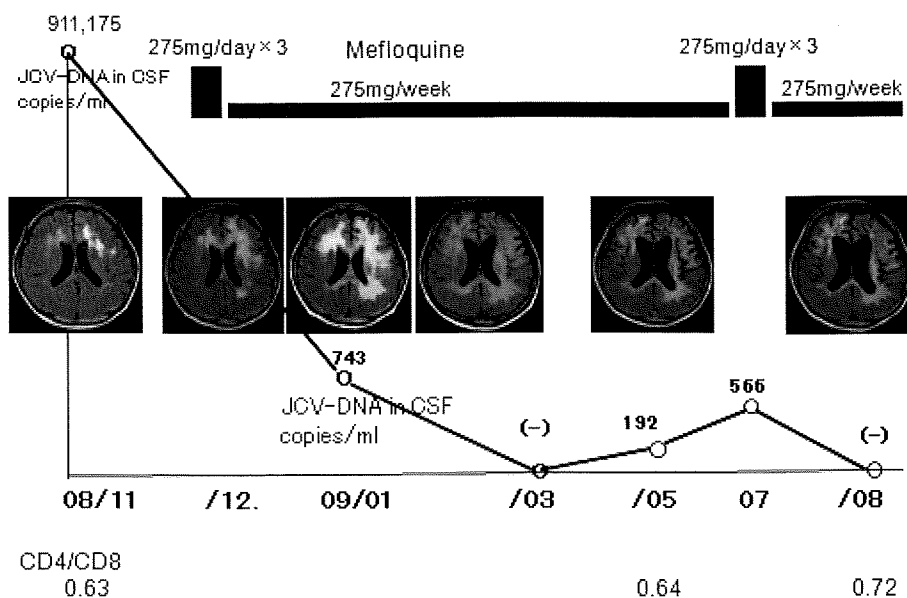


図 1. 症例 3. 画像所見と髄液 JCV 負荷量の推移

症例	PML 発症時 CD4 (/μL)	PML 発症時 HIV-RNA (copies/mL)	HAART 開始からの 発症・増悪 の時期	HAART	神経症状 改善 ・ 神経後遺症	在院 日数 (日)	併用薬
㊦ 24F	13	2.5×10^5	+4wk発症	継続	改善あり +(社会復帰)	195	
㊦ 33M	35	<400	+4wk発症	中断	死亡	705	Cidofovir
㊦ 36M	165	3.6×10^5	+5wk増悪	開始	改善あり +	90	
㊦ 37M	111	3.0×10^5	+4wk増悪	開始	改善あり ++	248	mPSLパルス
㊦ 41M	8	2.5×10^5	+3mon増悪	開始	改善あり ++	199	mPSLパルス
㊦ 42M	88	2.7×10^4	+4wk増悪	開始	改善あり ++	97	ステロイド
㊦ 36M	42	<400	+6wk発症	継続	改善あり +	81	メフロキン
㊦ 45M	165	2.6×10^4	+4wk増悪	開始	改善あり +	62	メフロキン

表1. HIV関連PMLの治療に関してHAART単独例とHAARTとメフロキン併用療法との比較(自例験)

症例	1	2	3	4	5
年齢/性	67/男	60/男	43/男	36/男	45/男
基礎疾患	SLE	不明	臍帯血移植後	HIV感染	HIV感染
臨床効果	有り	有り	有り	有り	有り
MRI効果	進行停止	進行停止	進行停止	進行停止	進行停止
髄液JCV			消失		
併用薬	Cidofovir Risperidone	なし	なし	HAART	HAART

表2. 今回メフロキンを使用した5例のPML症例のまとめ

進行性多巣性白質脳症における JC ウイルス感染細胞の変性メカニズム ～基礎疾患のなかった高齢者女性の剖検例から～

研究協力者：宍戸-原 由紀子 杏林大学医学部病理学教室

研究要旨

進行性多巣性白質脳症は JC ウイルス感染による脱髄疾患である。病理組織学的に、乏突起膠細胞にみられる核内ウイルス封入体が診断の指標となる。従来、核内ウイルス封入体は、乏突起膠細胞の腫大した核全体に広がるヘマトキシリン・エオシン染色に両染性の形態として知られていた (full inclusion)。これに加え近年我々は、免疫組織化学にて核膜近傍にドット状に集積するウイルス封入体も存在することも明らかにした (dot-shaped inclusion)。これは、JC ウイルスが promyelocytic leukemia (PML) ボディと呼ばれるドット状の核内構造で複製されるため、子ウイルスは核マトリックス様の構造に沿って核全体に広がり、この過程で PML ボディ構造は崩壊すると推測される。PML ボディは、細胞周期制御など、真核細胞の分裂・分化に関与する重要な核機能を担っている。その機能破綻は、発癌やポリグルタミン病などの神経変性疾患の発症とも関係すると報告がある。進行性多巣性白質脳症においても、ウイルス封入体形成に伴う核内構造の変化が、宿主グリア細胞の細胞変性を促す可能性が考えられる。

A. 研究目的

進行性多巣性白質脳症は JC ウイルス感染による脱髄疾患で、免疫不全の宿主に発症する。1958 年、悪性リンパ腫などのリンパ増殖性疾患の合併症として報告されたが、1980 年代の AIDS の流行、2005 年の多発性硬化症の治療薬 natalizumab の副作用としての発症など、その臨床的背景には変遷が見られる。病理学的に、多数の境界明瞭な脱髄斑(多巣性)が融合状に分布する(進行性)像が本疾患の特徴とされていたが、臨床的背景の変化に伴い病変分布も多様化してきた。しかしながら、一貫して、“乏突起膠細胞への JC ウイルス感染による髄鞘の脱落”が本疾患の病理であり、腫大した乏突起膠細胞様細胞の核内に見られるウイルス封入体は本疾患の診断を確定する。しかしながら、ウイルス封入体の形成に伴った核内環境、核内構造の変化につい

てはまだ研究されておらず、JC ウイルスに感染したグリア細胞の変性機序も不明な点が多い。また、JC ウイルス感染の標的である PML ボディの機能破綻が感染細胞の変性に関与すると推測されるが、詳細は未だ明らかでない。そこで我々は、PML ボディの重要な機能である細胞周期制御に注目し、核形態の変化の関連から、JC ウイルス感染がもたらす細胞変性機序について検討した。

B. 研究方法

本研究では、基礎疾患を認めなかった高齢者発症の進行性多巣性白質脳症の剖検例を用い、JC ウイルス感染がもたらす細胞変性機序を病理組織学的に解析した。近年、免疫不全の原因となる基礎疾患や病態が多様化し、また免疫抑制剤の適応も拡大している。基礎疾患を認めなかった高齢者発症の症例は、こ

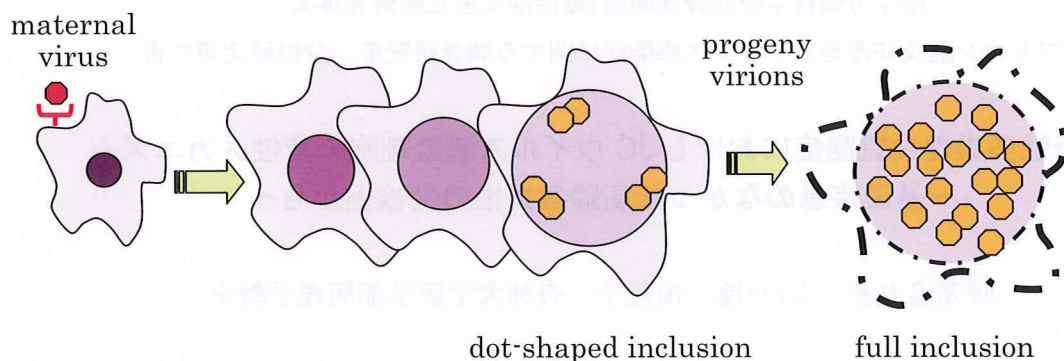


図1 グリア細胞の核面積は、JC ウイルス感染の進行度を反映するか？

うした臨床的変化の影響が少ないと考えられる。通常のホルマリン固定パラフィン包埋切片に、HE 染色、KB 染色、Bodian 染色の他、乏突起膠細胞の指標となる olig 2, JC ウイルスカプシド蛋白である VP1、細胞周期関連蛋白である PCNA, cycline A などの免疫染色を行い、画像解析ソフト (Metamorph) を用いて陽性細胞の核面積を計測した。さらに、グリア細胞の 17 番染色体のセントロメアに対し FISH を施行した。

(倫理面への配慮)

個人情報を使用しない。人体組織の扱いについては十分な注意をもって行う。

C. 研究結果

基礎疾患を認めなかった高齢者発症の進行性多巣性白質脳症の剖検例では、大脳白質に境界不明瞭な髄鞘の淡明化が広く認められた。皮髄境界は保たれ、皮質下白質で髄鞘脱落が見られたが神経線維は保たれていた。深部では変性・壊死に伴い神経線維は消失し、泡沫細胞の出現が目立った。従来、典型的とされている進行性多巣性白質脳症では、皮髄境界の近傍に境界明瞭な脱髄斑が融合性に分布し、特徴的な核内ウイルス封入体を有するグリア細胞は脱髄斑の辺縁に比較的局限して認められることが知られている。これに対し、髄鞘の淡明化が広がる本例では、脱髄と変性の進

行は軽度で、病変の境界は不明瞭であり、大小の腫大核を示すグリア細胞はびまん性に分布していた。グリア細胞の核面積は、病変の進行に伴い増加する傾向がうかがわれた。

免疫組織化学的に解析すると、乏突起膠細胞様細胞の約 25% が JC ウイルス VP1 陽性で、核全体にウイルスが広がる封入体 (full inclusion) と、PML ボディにドット状に集積する封入体 (dot-shaped inclusion) が混在していた。VP1 陽性細胞の核面積を計測すると、小型核と大型核の 2 つのピークの存在することが明らかになった。VP1 陽性細胞の小型核のピークは、olig-2 陽性細胞 (11%) のピークに一致した。また、乏突起膠細胞様細胞の約 68% が PCNA 陽性であったが、PCNA 陽性細胞のピークとも一致した。これに対し、VP1 陽性細胞の大型核のピークは、cycline A 陽性細胞 (10%) のピークと一致した。17 番染色体に対する FISH では、小型核に 4 倍体の存在が疑われたが、大型核をしめすグリア細胞には明らかな 4 倍体は確認できなかった。

D. 考察

JC ウイルス感染の標的である PML ボディは、細胞周期制御に重要な核内ドメインである。JC ウイルス感染により、小型核を有する乏突起膠細胞は、まず S 期様の細胞環境を提供してウイルスゲノム DNA の複製を支持し、子ウイルス増殖に伴い核面積を増加させ、

G2-M 様に細胞内環境を変化させると推測される。何故、細胞周期の活性化したグリア細胞が分裂せずに変性(細胞崩壊)するのか、今後の研究が期待される。

E. 結論

進行性多巣性白質脳症では、JC ウイルスに感染した乏突膠細胞の細胞周期は活性化しているが、正常な制御を逸脱していると考えられる。

[参考文献]

- 1) Shishido-Hara, Y., Hara, Y., Larson, T., Yasui, K., Nagashima, K., and Stoner, G.L. Analysis of Capsid Formation of Human Polyomavirus JC (Tokyo-1 strain) by a Eukaryotic Expression System: Splicing of Late RNAs, Translation and Nuclear Transport of Major Capsid Protein VP1, and Capsid Assembly. *J. Virol.* 74: 1840-1850, 2000
- 2) Shishido-Hara, Y., Shizuko Ichinose, Kayoko Higuchi, Yoshinobu Hara, and Kotaro Yasui. Major and Minor Capsid Proteins of Human Polyomavirus JC Cooperatively Accumulate to Nuclear Domain 10 for Assembly into Virions. *J. of Virol.* 78: 9890-9903, 2004
- 3) Shishido-Hara, Y., Higuch, K., Ohara, S., Duyckaerts, C., Hauw, J-J and Uchihara, T. Promyelocytic Leukemia Nuclear Bodies Provide a Scaffold for Human Polyomavirus JC Replication and Are Disrupted after Development of Viral Inclusions in Progressive Multifocal Leukoencephalopathy. *J. of Neuropath. and Exp. Neurol.* 67: 299-308, 2008

4) 宍戸-原 由紀子. 進行性多巣性白質脳症 (PML) -臨床医のための神経病理- *Clinical Neuroscience. 臨床神経科学* 27(3): 250-251, 2009

5) 宍戸-原 由紀子. 進行性多巣性白質脳症 (PML)の核内ウイルス封入体形成と細胞変性における PML ボディの役割 -JC ウイルスの分子生物学から、進行性多巣性白質脳症の人体病理学まで- *病理と臨床* 26(9): 999-1006, 2008

6) 宍戸-原 由紀子, 内原俊記. What you can see in a single picture? 進行性多巣性脳症 (PML) と PML ボディ 癌化か? 変性か? -ウイルス感染による PML ボディの機能破綻がもたらす細胞の運命- *Brain Medical* 20(3): 207-209, 2008

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表 (2009/4/1~2010/3/31 発表)

1. 論文発表

なし。

2. 学会発表

1) 宍戸-原 由紀子. 進行性多巣性白質脳症の PML ドット. 第 98 回日本病理学会総会, 京都, 2009.5

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

JC ウイルス感染におけるメチル化遺伝子結合蛋白 MeCP2 の役割の解析

研究協力者：長嶋 和郎 札幌東徳州会病院・病理部

研究協力者：高橋 健太 北海道大学大学院医学研究科腫瘍病理学分野

研究協力者：高阪 真路 北海道大学大学院医学研究科腫瘍病理学分野

研究協力者：工藤 伸一 北海道立研究所・疫学部ウイルス科

研究協力者：澤 洋文 北海道大学人獣共通感染症リサーチセンター 分子病態・診断部門

研究協力者：田中 伸哉 北海道大学大学院医学研究科腫瘍病理学分野

研究要旨

JC virus (JCV) は 80% のヒトに不顕性感染し、持続感染している polypomavirus である。主として免疫不全に陥ったヒトにて活性化し、大脳脱髄疾患である進行性多巣性白質脳症 (progressive multifocal leukoencephalopathy: PML) を発症する。Rett 症候群は女兒に精神身体発達遅延を生ずる疾患で、近年その原因がメチル化遺伝子に結合して転写を制御する X 連鎖性の methyl-CpG-binding protein 2 (MeCP2) 遺伝子の変異であることが判明した。最近 MeCP2 がヘルペス系ウイルスの持続感染に関連していることが報告された。JC ウイルスはヒトに持続感染していること、JC ウイルスの T 抗原 coding 領域には CG 配列が多い、などの知見を基に PML と MeCP2 の関連を免疫染色で検索した結果、PML 脳において MeCP2 は JCV 感染細胞核に高度に発現していることが判明した。そこで、MeCP2 が JCV の蛋白で最も大きな蛋白である large T 抗原と結合している可能性を検討した。その結果、JCV large T 抗原と MeCP2 は直接結合していないことが明らかとなった。今後、JCV の他の蛋白との結合有無、さらに JCV による MeCP2 転写の亢進などに関する研究が重要であることが示唆された。

A. 研究目的

JCV の持続感染機構と PML 発症機序の解明のため、メチル化遺伝子 CpG に結合し、その転写を制御する MeCP2 との関連を免疫染色にて検索した結果、JCV に感染して腫大した oligodendroglia 核に MeCP2 が著明に発現していることが判明した¹⁾。この高発現の機序に関する仮説として、JCV 関連蛋白と結合し、タンパク分解が阻害されている場合、あるいは JCV 関連分子が MeCP2 の転写活性を亢進させていること、などが想定された。そこで、第一の仮説を検証する目的で、JCV 関連蛋白との結合を検討した。JCV は large T,

small t, VP1, VP2, VP3, Agnoprotein の 6 種の蛋白をコードしており、その中でも最大の蛋白が large T 抗原 (通称 SV40 large T antigen に準じて T 蛋白を T 抗原と記載する) と呼ばれる分子量約 7 万の蛋白である。JCV と同じ polyomavirus 属である SV40 の研究で large T 抗原は多機能蛋白であることが知られて、良く研究されている蛋白である。今回、まず JCV large T 抗原 (JCT) と MeCP2 との結合の有無を検討することとした。

B. 研究方法

JCT 抗原と MeCP2 の結合解析

- 1) 293T 細胞株に、JCV 初期蛋白である JCT と MeCP2 それぞれの遺伝子発現ベクター pCXN2-Flag-JCT²⁾ および pEGFP-MeCP2³⁾ を transfection させた。
- 2) Western blotting (WB) 法にて抗 Flag M2 抗体および抗 MeCP2 抗体 (RA7)³⁾ を使用し、293T 細胞における蛋白発現を解析した。
- 3) JCT を、抗 Flag M2 抗体を使用して免疫沈降し、抗 MeCP2 抗体を用いた WB 法にて MeCP2 の結合の有無を解析した。

(倫理面への配慮)

本実験で使用している JCV は P2 対応のウイルスであり、本研究は北海道大学大学院医学研究科腫瘍病理学分野の P2 指定実験室にて安全性に留意して行われた。

C. 研究結果

- 1) 293T 細胞へ JCT を transfection すると抗 JCT 抗体 (Flag M2) による検索で JCT の発現が認められた (図 1 左上段, lane 5, 7, 8)。また MeCP2 の transfection では抗 MeCP2 抗体 (RA7) でその発現が認められた (図 1 左下段, lane 3, 7)。JCT と MeCP2 の両方を発現させた lane 7 では両方の蛋白の発現が観察された。
- 2) 免疫沈降法にて JCT と MeCP2 の結合を検索したが、予想される分子量約 18 万の位置に陽性 band が検出できなかった。この結果、今回の発現システムでは JCT と MeCP2 との直接結合は認められなかった。

D. 考察

今回の実験では 293T 細胞への JCT と MeCP2 の transfection が Western blotting 法にて確認されたが、免疫沈降法にて JCT と MeCP2 の結合は確認されなかった。

蛋白発現が容易な 293T 細胞を使用した方が 293T 細胞には SV40 large T が発現しており

JCT の発現を干渉している可能性が考えられる。今後、同様な実験を他の細胞を用いて検討することが必要と思われた。また、我々は JCV 持続感染細胞株を有しており、同細胞株での検索も重要と思われた。

JCV 感染細胞における MeCP2 が過剰発現の機序に関しては、MeCP2 が JCV 感染細胞内で代謝されずに蓄積する可能性や、遺伝子からの MeCP2 産生が亢進する機序などが考えられる。JCV がコードする small t 抗原や後期外郭蛋白である VP1, VP2, VP3 蛋白, agnoprotein との関連については未解析であり、今後これらの蛋白との結合に関して検討する必要性が示唆された。また、MeCP2 遺伝子の promotor 領域に JCV 関連蛋白が作用して MeCP2 の発現を亢進させていることも予想される。今後、JCT と MeCP2 の関連について、promotor assay を用いた MeCP2 の転写制御の検討や、ユビキチン化による MeCP2 分解阻害の検討を進めることが重要と考えられた。

E. 結論

PML 脳の検索において JCV 感染細胞では MeCP2 が高発現していることが示され、その機序の解明として JCT が MeCP2 と結合している可能性を検索した。293T 細胞を用いて各蛋白を発現させ、免疫沈降方で検索した結果、両蛋白の直接結合は認められなかった。

[参考文献]

- 1) 長嶋和郎, 白井紗矢, 塚本 哲, 磯貝 浩, 工藤伸一. PML 脳での JCV 感染細胞における MeCP2 の発現に関する検討. 厚生労働科学研究費補助金. 難治性疾患克服研究事業. プリオン病及び遅発性ウイルス感染症に関する調査研究. 平成 20 年度総括・分担研究報告書. 177-181, 2009. 3
- 2) Sunden Y, Suzuki T, Orba Y, Umemura T, Asamoto M, Nagashima K, Tanaka S,

Sawa H. Characterization and application of polyclonal antibodies that specifically recognize JC virus large T antigen. *Acta Neuropathol.* 111: 379-387, 2006

- 3) Kudo S. Methyl-CpG-binding protein MeCP2 represses Sp1-activated transcription of the human leukosialin gene when the promoter is methylated. *Mol Cell Biol.* 18: 5492-5499, 1998

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表(2009/4/1~2010/3/31 発表)

1. 論文発表

- 1) Oshima K, Tsuchiya K, Niizato K, Akiyama H, Arai T, Nagashima K. Clinicopathological study of early progressive multifocal leukoencephalopathy incidentally found in a schizophrenia patient. *Neuropathology.* 29: 684-688, 2009
- 2) 長嶋和郎, 福原敏行. 免疫再構築症候群. *Clinical Neuroscience.* 27: 850-851, 2009
- 3) Shirai S, Takahashi K, Kohsaka S, Tsukamoto T, Isogai H, Kudo S, Sawa H,

Nagashima K, Tanaka S. High expression of MeCP2 in JC virus-infected cells of progressive multifocal leukoencephalopathy brains. *Neuropathology.* 2010; submitted.

2. 学会発表

- 1) 長嶋和郎. 進行性多巣性白質脳症 PML 研究の進展とその成果. 第 42 回日本神経病理学会北海道地方会, 札幌, 2009.11.14

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

- 1) JC ウイルス agno を対象とした PML の治療(特願 2001-356836 号)
- 2) JC ウイルスの VP-1 に対する siRNA、およびそれを含有してなる医薬組成物(特願 2006-513677 号)
- 3) 注意欠陥多動性障害の評価方法(特願 2008-171035)
- 4) Clspn 遺伝子発現を指標とする精神疾患の評価方法(特願 2008-171036)

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

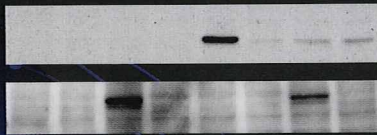
結果

293T細胞へのJCT抗原とMeCP2のtransfection

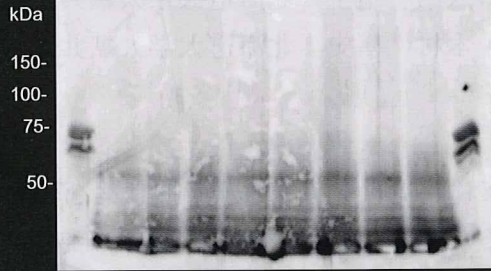
JCT抗原とMeCP2の結合についての免疫沈降法による解析

- ① - / -
- ② - / pEGFP-C1
- ③ - / pEGFP-MeCP2
- ④ - / pcdMP4
- ⑤ pCXN2-Flag-JCT1-
- ⑥ JCT / pEGFP-C1
- ⑦ JCT / pEGFP-C1
- ⑧ JCT / pEGFP-MeCP2

- ① - / -
- ② - / pEGFP-C1
- ③ - / pEGFP-MeCP2
- ④ - / pcdMP4
- ⑤ pCXN2-Flag-JCT1-
- ⑥ JCT / pEGFP-C1
- ⑦ JCT / pEGFP-C1
- ⑧ JCT / pEGFP-MeCP2



上段: 抗JCT抗体(Flag M2)
下段: 抗MeCP2抗体(RA7)



IP: 抗JCT抗体(Flag M2)
IB: 抗MeCP2抗体(RA7)

kDa
150-
100-
75-
50-

本研究は、JCT抗原とMeCP2の結合について、免疫沈降法を用いて解析した。293T細胞にJCT抗原とMeCP2を共発現させた場合、両タンパク質は互に結合する。この結果は、JCT抗原とMeCP2が物理的に結合していることを示している。また、JCT抗原とMeCP2の結合は、pEGFP-MeCP2とpEGFP-C1の共発現によるものではない。さらに、JCT抗原とMeCP2の結合は、pCXN2-Flag-JCT1-とpEGFP-C1の共発現によるものでもない。これらの結果は、JCT抗原とMeCP2の結合が、特定のJCT抗原とMeCP2の相互作用によるものであることを示している。

本研究の目的は、JCT抗原とMeCP2の結合について、免疫沈降法を用いて解析することである。JCT抗原とMeCP2の結合は、特定のJCT抗原とMeCP2の相互作用によるものである。本研究の結果は、JCT抗原とMeCP2の結合が、特定のJCT抗原とMeCP2の相互作用によるものであることを示している。また、JCT抗原とMeCP2の結合は、pEGFP-MeCP2とpEGFP-C1の共発現によるものではない。さらに、JCT抗原とMeCP2の結合は、pCXN2-Flag-JCT1-とpEGFP-C1の共発現によるものでもない。これらの結果は、JCT抗原とMeCP2の結合が、特定のJCT抗原とMeCP2の相互作用によるものであることを示している。

JC ウイルス large T 抗原による G2 期停止機構と G2 チェックポイント阻害剤によるウイルス増殖抑制

研究分担者：澤 洋文 北海道大学人獣共通感染症リサーチセンター分子病態・診断部門
研究協力者：大場 靖子 北海道大学人獣共通感染症リサーチセンター分子病態・診断部門
研究協力者：木村 享史 北海道大学人獣共通感染症リサーチセンター分子病態・診断部門

研究要旨

本研究では、JC ウイルス感染抑制薬を開発するための標的になり得る宿主細胞因子を同定するために、JC ウイルスが感染細胞内においてウイルス DNA の複製を行う際に必要となる宿主細胞機構について、細胞周期との関連性を中心に解析を行った。その結果、JCV 感染細胞では、ウイルスの早期タンパク質である TAg が発現することにより、ATM/ATR を介した G2 チェックポイントシグナルが誘導され、細胞周期が G2 期に停止することが判明した。G2 チェックポイント機構を ATM/ATR 阻害剤であるカフェインなどにより阻害し G2 期停止を解除した結果、JC ウイルスの複製効率が顕著に低下することから、G2 期停止は JC ウイルス複製の促進に必要であることが判明した。JC ウイルス感染細胞においてカフェインはウイルス増殖を阻止することが可能であったことから、JC ウイルス感染抑制薬として有用である可能性が示唆された。

A. 研究目的

JC ウイルス (JCV) は、human polyomavirus に属し、致死性中枢神経系脱髄疾患である進行性多巣性白質脳症 (Progressive multifocal leukoencephalopathy, PML) の原因ウイルスである。近年免疫抑制療法の普及や acquired immune deficiency syndrome (AIDS) の流行に伴って PML が益々問題になって来ているが、未だ有効な治療法は確立していない。JCV は Polyomavirus family に属する二重鎖環状 DNA ウイルスである。JCV ゲノムは 5,130 塩基から成り、三つの領域に分けられ、調節領域を基点に反時計回り方向に Large T 抗原 (TAg) と small t 抗原、時計回り方向に agnoprotein、VP2、VP3、VP1 の合計 6 種類の蛋白をコードしている。調節領域は早期と後期蛋白転写領域の間にあり、複製の開始起点及び転写調節領域を含む。ウイルスゲノ

ムの複製は宿主細胞の核内で行われ、複製にはウイルス早期タンパク質である TAg の発現が必須である。TAg は Helicase 活性を有し、宿主細胞内の複製因子を利用しウイルス DNA の複製を行う。これまでに TAg は pRb や p53 と結合し細胞周期を S 期に進行させることが知られているが、JCV 感染細胞におけるウイルス DNA 複製と細胞周期の関連性については詳細な検討がなされていない。本研究では、TAg 発現細胞の細胞周期を解析した結果 G2 期に集積することが判明したことから、TAg による G2 期停止の機序およびウイルス複製との関連性を検討した。

B. 研究方法

JCV 感染後 2 週間目のヒト神経芽細胞腫 IMR-32 細胞、および IMR-32 細胞に pCXN₂-TAg をトランスフェクションし TAg

を単独発現させた細胞における細胞周期をフローサイトメトリーにて解析した。G2 期停止を誘導する G2 チェックポイントシグナル経路の活性化をリン酸化抗体を用いた蛍光免疫染色およびイムノブロットングにて解析した。さらに TAg の核内局在が変化する変異体を作成し、G2 チェックポイント誘導の機序を検討した。また、G2 チェックポイントシグナルに関わる kinase の阻害剤であるカフェイン (ATM/ATR 阻害剤)、UCN-01 (Chk1 阻害剤) および Wee1 に対する siRNA を用いて G2 期停止を解除し、JCV ori を含むプラスミドを用いた DpnI replication assay によりウイルス DNA 複製効率への影響を検討した。さらに、JCV 感染細胞をカフェイン存在下で 3 日から 9 日培養し、ウイルスタンパク質発現およびウイルス感染価を、それぞれイムノブロットング、赤血球凝集反応により検討した。

(倫理面への配慮)

本研究では、JCV の感染機構の解析を目的とした。本実験で用いられた JCV は P2 で扱うべきウイルスであり、本研究は当施設の P2 指定実験室にて安全性に留意して行なわれた。本研究の内容は、北海道大学の組換え DNA 申請において承認を得ている [承認番号 20 (22)]。

C. 研究結果

TAg 陽性の JCV 感染細胞および TAg 単独発現細胞は G2 期に集積していた (図 1)。これらの細胞では ATM および ATR を介した経路で G2 チェックポイントが活性化されていることが明らかとなった (図 2)。チェックポイント活性化の機序として、TAg の宿主細胞 DNA への結合性や核マトリックスへの局在が DNA 損傷シグナルの誘導に関与していることが示唆された。さらに、TAg 発現による G2 期停止をカフェイン、UCN-01 および

Wee1 に対する siRNA により解除した結果、ウイルス DNA 複製効率が顕著に低下した (図 3)。カフェイン処理した JCV 感染細胞では、ウイルスタンパク質発現が著明に減少し、ウイルス感染価は検出限界以下となった (図 4、5)。また、JCV 感染症である進行性多巣性白質脳症 (PML) の組織を用いた免疫染色の結果、JCV 感染オリゴデンドロサイトにおいても G2 期停止が誘導されている所見が得られた。

D. 考察

JCV 感染細胞では、TAg が G2 チェックポイントを誘導することで細胞周期が G2 期に停止し、ウイルス複製の場となっていることが明らかとなった。G2 期停止を解除し細胞分裂が進行した場合、JCV の複製効率が顕著に低下することが判明したことから、カフェインなどの ATM/ATR 阻害剤が JCV 感染抑制に有用であることが示唆された。PML 症例の脳内 JCV 感染細胞においても同様に G2 期停止状態であることが示唆されたことから、カフェインが体内においても JCV 増殖抑制効果を示す可能性があると考えられた¹⁾。

E. 結論

JCV は G2 チェックポイント活性化により G2 期停止した細胞内でウイルスゲノム複製を行っていることから、G2 期停止を阻害するカフェインが JCV の増殖を抑制することが明らかになった。

[参考文献]

- 1) Orba Y, Suzuki T, Makino Y, Kubota K, Tanaka S, Kimura T, Sawa H*. Large T antigen promotes JC virus replication in G2-arrested cells by inducing ATM- and ATR-mediated G2 checkpoint signaling. *J Biol Chem* (* corresponding author) (in press)

F. 健康危険情報

特に無し

G. 研究発表(2009/4/1~2010/3/31 発表)

1. 論文発表

- 1) Suzuki T, Orba Y, Okada Y, Sunden Y, Kimura T, Tanaka S, Nagashima K, Hall WW, Sawa H*. The human polyoma JC virus agnoprotein acts as a viroporin. *PLoS Pathogens* (* corresponding author) (in press)
- 2) Orba Y, Suzuki T, Makino Y, Kubota K, Tanaka S, Kimura T, Sawa H*. Large T antigen promotes JC virus replication in G2-arrested cells by inducing ATM- and ATR-mediated G2 checkpoint signaling. *J Biol Chem* (*corresponding author) (in press)
- 3) Kitagawa Y, Maeda-Sato M, Tanaka K, Tobiume M, Sawa H, Hasegawa H, Kojima A, Hall WW, Kurata T, Sata T, Takahashi H. Covalent bonded Gag multimers in Human Immunodeficiency virus type-1 particles. *Microbiol Immunol* (in press)
- 4) 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, Hasegawa H. Induction of cross-protective immunity against influenza A virus H5N1 by intranasal vaccine with mycelia extracts of mushroom. *J Med Virol* (in press)
- 5) Niikura K, Nagakawa K, Ohtake N, Suzuki T, Matsuo Y, Sawa H, Ijio K. Gold nanoparticle arrangement on viral particles through carbohydrate recognition: A non-crosslinking approach to optical virus detection. *Bioconjug Chem* 20(10): 1848-1852, 2009
- 6) Hasebe R, Sasaki M, Sawa H, Wada R, Umemura T, Kimura T. Infectious entry of equine herpesvirus-1 into host cells through different endocytic pathways. *Virology* 393(2): 198-209, 2009
- 7) 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* 11(13): 1019-1028, 2009
- 8) Simulundu E, Mweene AS, Tomabeche D, Hang'ombe BM, Ishii A, Suzuki Y, Nakamura I, Sawa H, Sugimoto C, Ito K, Kida H, Saiwana L, Takada A. Characterization of H3N6 avian influenza virus isolated from a wild white pelican in Zambia. *Arch Virol* 154(9): 1517-1522, 2009

2. 学会発表

- 1) Suzuki T, Orba Y, Sunden Y, Kimura T, Sawa H. Viroporin activity of JCV agnoprotein. The 9th International Symposium in NeuroVirology, June 2-6, 2009, Florida, USA
- 2) Nagakawa K, Niikura K, Ohtake N, Suzuki T, Matsuo Y, Sawa H, Ijio K. Gold nanoparticle array based on the surface structure of virus. International Symposium on Engineering Neo-Biomimetics, Oct. 9-10, Tokyo, Japan
- 3) Ohtake N, Niikura K, Suzuki T, Mikuni

- S, Matsuo Y, Nagakawa K, Kinjo M, Sawa H, Ijro K. Preparation of functionalized virus-like particles enabling pH-mediated release of target molecules, March 25-26, 2010, Tomakomai, Japan
- 4) 澤 洋文. JC ウイルスの増殖機構解明と PML の治療法開発. プリオン病及び遅発性ウイルス感染症に関する調査研究班ワークショップ “亜急性硬化性全脳炎 (SSPE) および進行性多巣性白質脳症 (PML) の発症機序と治療法開発への展望”, アルカディア市ヶ谷, 東京, 2009. 7.17
- 5) 川口 晶, 大場靖子, 木村享史, 伊波英克, 緒方正男, 辻 隆裕, 佐多徹太郎, 澤 洋文, 長谷川秀樹. ヒト ATL 細胞及び Tax トランスジェニックマウス由来腫瘍細胞の SDF-1 α に対する走化性とその阻害. 東京大学, 東京, 2009.8.29-30
- 6) 小林進太郎, 鈴木忠樹, 大竹範子, 永川桂大, 新倉謙一, 木村享史, 澤 洋文. JC ウイルスの粒子形成機構の解析. 第 57 回日本ウイルス学会総会, 東京都市センターホテル, 東京, 2009.10.25-27
- 7) 鈴木忠樹, 仙葉慎吾, 大場靖子, 寸田祐嗣, 木村享史, 長嶋和郎, 澤 洋文. JCV ウィルス Agnoprotein によるウイルス粒子の形態制御. 第 57 回日本ウイルス学会総会, 東京都市センターホテル, 東京, 2009. 10.25-27
- 8) 佐々木道仁, 長谷部理絵, 谷山弘行, 澤 洋文, 木村享史. ウマヘルペスウイルス 1 型レセプターのクローニングと機能解析. 第 57 回日本ウイルス学会総会, 東京都市センターホテル, 東京, 2009.10.25-27
- 9) 奥村 恵, 木村享史, 大場靖子, 澤 洋文. ラット神経由来 CSM14.1 細胞株における日本脳炎ウイルス感受性. 第 57 回日本ウイルス学会総会, 東京都市センターホテル, 東京, 2009.10.25-27
- 10) 鈴木忠樹, 大場靖子, 岡田由紀, 寸田祐嗣, 木村享史, 田中伸哉, 長嶋和郎, 澤 洋文. The human Polyoma JC virus acts as a viroporin. 第 32 回日本分子生物学会年会, パシフィコ横浜, 横浜, 2009.12.9-12
- 11) 大竹範子, 新倉謙一, 鈴木忠樹, 永川桂大, 澤 洋文, 居城邦治. ウィルス微粒子への蛍光タンパク質内包技術の開発. 第 19 回バイオ・高分子シンポジウム, 東京, 2009.7.29-30
- 12) 大竹範子, 新倉謙一, 鈴木忠樹, 永川桂大, 澤 洋文, 居城邦治. ペプチドタグを用いたウイルスナノカプセルへの目的分子内包. 第 19 回バイオ・高分子シンポジウム, 第 58 回高分子討論会, 熊本, 2009. 9.16-18
- 13) 永川桂大, 新倉謙一, 大竹範子, 鈴木忠樹, 松尾保孝, 澤 洋文, 居城邦治. ウィルスカプセルを中心とした金ナノ粒子の三次元配列構造体とその光学応答. 第 19 回バイオ・高分子シンポジウム, 第 58 回高分子討論会, 熊本, 2009.9.16-18
- 14) 大竹範子, 新倉謙一, 鈴木忠樹, 三國新太郎, 永川桂大, 金城政孝, 澤 洋文, 居城邦治. pH に応答した分子放出のためのウイルスナノカプセルの機能化. 日本化学会第 90 春季年会, 大阪, 2010.3.26-29
- H. 知的財産権の出願・登録状況
1. 出願中の特許
- 1) 抗 JC ウィルス剤及び進行性多巣性白質脳症治療剤 (特願 2008-276126)。発明者: 大場靖子, 澤 洋文. 出願年月日 平成 20 年 9 月 30 日
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

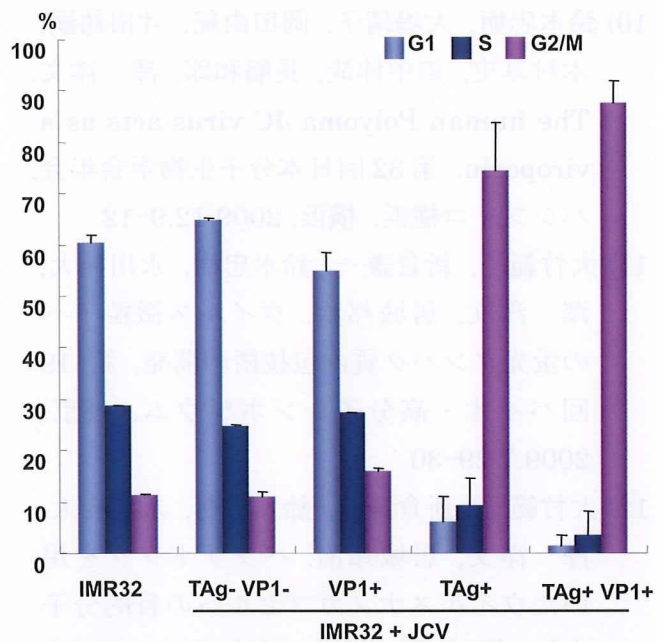


図1 JCV 感染細胞のうち TAg 発現細胞は G2 期に集積していた。

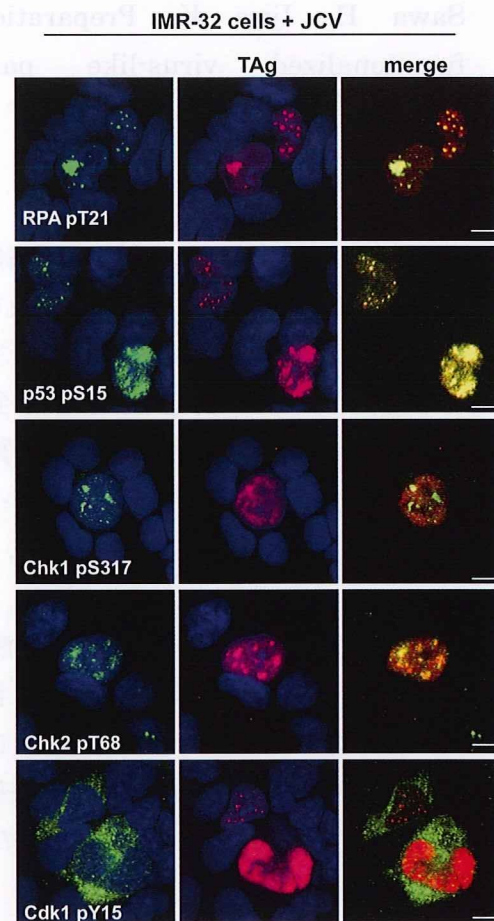


図2 JCV 感染細胞では TAg と共局在して G2 チェックポイントシグナルに関わるタンパク質のリン酸化が見られた。

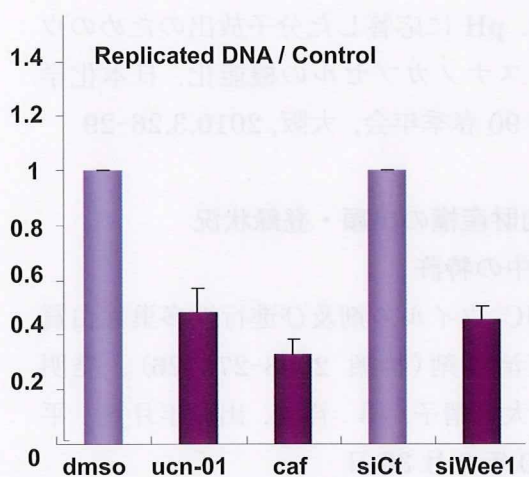


図3 G2 期停止を阻害する ucn-01、caffeine (caf)、siWee1 を処理した細胞では、JCV の DNA 複製効率が低下した。



図4 JCV 感染細胞に Caffeine を加えて 3 日後、6 日後の細胞では、コントロールに比べウイルスタンパク質 TAg、VP1、Agno の発現が減少した。

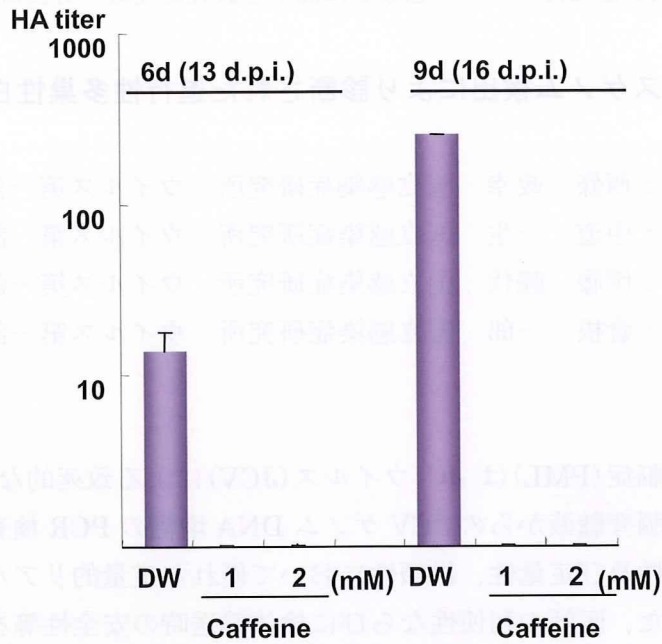


図5 JCV感染細胞にCaffeineを加えて6日後、9日後の細胞では、ウイルス感染価(HA titer)が検出されなかった。

脳脊髄液中 JC ウイルスゲノム検出により診断された進行性多巣性白質脳症患者の解析

研究分担者：西條 政幸 国立感染症研究所 ウイルス第一部第三室
研究協力者：中道 一生 国立感染症研究所 ウイルス第一部第三室
研究協力者：伊藤 睦代 国立感染症研究所 ウイルス第一部第三室
研究協力者：倉根 一郎 国立感染症研究所 ウイルス第一部

研究要旨

進行性多巣性白質脳症(PML)は JC ウイルス(JCV)による致死的な脱髄疾患であり、その診断においては脳脊髄液からの JCV ゲノム DNA 増幅の PCR 検査が有効である。当研究室では、迅速性及び定量性、信頼性において優れた定量的リアルタイム PCR 検査系を確立した。また、医師の利便性ならびに検体輸送時の安全性等を考慮した検査体制を整備し、平成 19 年 4 月より国内の医療機関における PML の診断支援を開始した。平成 19 年 4 月から平成 21 年 12 月までの 2 年 9 ヶ月間に、39 都道府県の医療機関から依頼のあった計 254 名の患者の脳脊髄液について検査を実施し、全体の 30 名(12%)から JCV-DNA が検出された。また、同一患者において複数回の定量検査が実施された場合には、症状の進行もしくは改善に伴って JCV-DNA 量の変動することが示された。また、診断支援を介して医療機関から提供された調査票に基づいてデータベースを構築し、各基礎疾患や年齢層、地域等における PML の発生状況を明らかにした。以上の結果より、本検査系が PML の診断や治療における有用な検査技術となること、ならびに、構築したデータベースが国内の PML を多面的に解析する上で有用な基盤的情報となることが示された。

A. 研究目的

進行性多巣性白質脳症(Progressive Multifocal Leukoencephalopathy: PML)は、免疫不全患者等の脳において JC ウイルス(JCV)が増殖することで引き起こされる脱髄疾患で、致死的である。PML の診断には特異性および侵襲性の点から、脳脊髄液を用いた JCV ゲノム DNA の PCR 検査が優先される。また、海外ではリアルタイム PCR を用いた髄液検査が導入されており、優れた迅速性および特異性、信頼性を発揮している。本研究では、リアルタイム PCR を基盤とした JCV の脳脊髄液検査体制を整備し、医療機関への診断支援を介して国内の PML に関する

基盤データを構築することを目的とした。JCV 検査による PML の診断支援を開始した平成 19 年 4 月から平成 21 年 12 月までの検査実績およびデータの解析結果を報告する。

B. 研究方法

1) 材料

PCR における陽性対照 DNA として JCV ゲノムを含むプラスミド(pJCV、JCRB より分与)を用いた。リアルタイム PCR 機器として LightCycler(Roche)を、PCR 試薬として LightCycler 480 Probes Master(Roche)を用いた。脳脊髄液からの DNA 抽出には QIAamp DNA Blood Mini Kit(QIAGEN)を

用いた。

2) リアルタイムPCR検査系

JCV の T 遺伝子と VP1 遺伝子、ならびに陽性対照 DNA に対して特異的な配列を標的として、計 3 種類のプライマーおよび TaqMan プロブを作製し、リアルタイム PCR に使用した。各 PCR は、高い特異性および検出感度(数コピー/反応)を示し、JCV と近縁な BKV の DNA を増幅せず、さらに、臨床検体を用いた JCV 検査においても優れた信頼性を有する。また、本研究において確立したリアルタイム PCR は、JCV ゲノムの転写調節領域を標的とした nested-PCR(既報告)と同程度の感度および特異性を有することが確認された。

3) 脳脊髄液を用いたPMLの診断支援

検査依頼の効率化を図るため、JCV 検査の受付に関するホームページ(HP)を開設した(<http://prion.umin.jp/pml/virus.html>)。本 HP は、検索サイトにおいてキーワード(JC ウイルス検査)を入力することでアクセスが可能である。検査依頼を受けた際には、国連規格の包装容器を依頼先に搬送した。容器と共に返送された脳脊髄液から DNA を抽出し、リアルタイム PCR による定性検査を実施した。また、JCV 陽性の脳脊髄液については、検体に含まれる JCV ゲノムのコピー数を測定した。

(倫理面への配慮)

本研究は、国立感染症研究所ヒトを対象とする医学研究倫理審査委員会において承認された上で実施した。

C. 研究結果

1) 脳脊髄液による JCV 検査の受付状況

平成 19 年 4 月より国内の医療機関での PML の診断支援を開始し、平成 21 年 12 月までの 2 年 9 ヶ月間において 39 都道府県から 291 件の検査依頼を受けた。依頼経由とし

てはホームページからの新規依頼が 179 件(62%)、過去に依頼を受けた医師からの再依頼(再検査を含む)が 81 件(28%)、研究班員等からの紹介が 31 件(11%)であった。

2) 脳脊髄液による JCV 検査の結果

上記の期間において、計 291 検体(再検査を含む)の脳脊髄液のリアルタイム PCR 検査(定性検査)を実施し、40 検体(14%)から JCV の T 遺伝子および VP1 遺伝子領域を検出した。また、JCV-DNA 陽性の脳脊髄液を対象とした定量検査を実施した結果、検体中のウイルス DNA は、1 mL あたり $10E2$ コピーから $10E9$ コピーの範囲内であることを示した。加えて、同一患者において複数回の検査を行った場合には、症状の悪化に伴う JCV DNA 量の増加(白血病患者)および、症状の停止もしくは改善に伴う JCV-DNA 量の減少(HAAT 施行患者、メフロキン投与患者)が観察された。

3) 脳脊髄液JCV陽性者の年齢層

上記期間において検査依頼を受けた患者 254 名(再検査を除く)のうち、30 名(約 12%)の患者の脳脊髄液から JCV-DNA が検出され、PML と診断された。PML 患者の年齢層としては、0~20 歳代が 2 名(7%)、30~40 歳代が 13 名(43%)、50~60 歳代が 10 名(33%)、70~80 歳代が 5 名(17%)であった。PML 患者の基礎疾患としては、血液疾患が 11 名(37%)、HIV 感染症が 10 名(33%)、自己免疫疾患が 3 名(10%)、その他の疾患が 6 名(20%)であった。

4) 血液疾患における JCV 陽性患者の内訳

検査対象者(47 名)における脳脊髄液中 JCV 陽性者は 11 名(23%)であった。内訳は白血病が 5 名、再生不良性貧血が 2 名、リンパ腫が 3 名、骨髄腫が 1 名であった。また、全体の 8 名(73%)が同種骨髄幹細胞移植、臍帯血幹細胞移植、または、自家末梢血幹細胞移植患者であった。

5) 血液疾患以外の基礎疾患における JCV 陽性患者

HIV 感染症を基礎疾患とする検査対象者 51 名における脳脊髄液中 JCV 陽性者数は 10 名 (20%) であった。また、自己免疫疾患患者 33 名における JCV 陽性者は 3 名 (9%) で、主たる基礎疾患は全身性エリテマトーデスであった。上記以外の疾患を有する JCV 陽性者は検査対象者 48 名のうち 6 名 (13%) で、基礎疾患は、サルコイドーシス、肝硬変、間質性肺炎、肺結核、原発性免疫不全症候群であった。

D. 考察

本研究では、脳脊髄液を用いた JCV 検査によって医療機関における PML の診断を支援し、国内の PML の発生状況を解析することが目的である。2 年 9 ヶ月間において計 291 件の JCV 検査を担当し、本検査系が PML の検査技術として有用であることが明らかにされた。また、検査を受け付ける際に質問票を介して情報を集積し、国内の PML に関するデータベースを構築した。

2 年 9 ヶ月間の検査実施期間において、当室が診断を支援した PML 患者は 30 例で、その患者の基礎疾患の多くは、血液疾患および HIV 感染症で占められていた。また、両者の基礎疾患における PML 患者はそれぞれ検査対象者の約 20% であり、他の疾患と比較して高い割合を占めていた。さらに、70~80 歳代の高齢者における JCV 陽性症患者は、基礎疾患として肝疾患もしくは肺疾患を有していた。これらの結果は、本研究において構築したデータベースが、国内の PML を、基礎疾患や年齢といった様々な角度から分析する上で重要な基盤的情報となりうることを示している。

脳脊髄液を対象とした定量検査の結果、HIV 感染症ならびに血液疾患等を基礎疾患とする PML 患者では、症状の程度と脳脊髄液中のウイルス DNA 量との間に相関性がある

ことが示唆された。今後、より詳細に検討したいと考えている。PML の症状が停止もしくは改善した患者においては、脳脊髄液中の JCV-DNA 量が症状の変化よりも早い段階において減少することが示唆される成績を得た。また、HAART を施行された HIV 患者では、脳浮腫によって MRI による解析が困難な状況においても JCV のリアルタイム PCR 検査により PML の改善が予測される例も経験した。これらの結果は、JCV の定量検査が PML の進行の把握ならびに治療方針の決定において有用な検査技術であることを示唆している。

上記の期間において 1 件以上の検査依頼を受けた都道府県は全体の約 83% であり、ホームページを中心として依頼数が増加傾向にある。当室の JCV 検査の存在が全国の医療機関に認知され始めたことを示唆している。今後は、医療機関における PML 診断のカバー率を向上させ、より広範囲かつ詳細なデータを蓄積することが課題となる。

E. 結論

リアルタイム PCR を基盤とした JCV ゲノム DNA の検査に基づいて PML の診断支援を実施し、国内の PML に関するデータベースを解析した。

[参考文献]

該当なし

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Iizuka I, Saijo M, Shiota T, Ami Y, Suzaki Y, Nagata N, Hasegawa H, Sakai K, Fukushi S, Mizutani T, Ogawa M, Nakauchi M, Kurane I, Mizuguchi M,

- Morikawa S. Loop-mediated isothermal amplification-based diagnostic assay for monkeypox virus infections. *Journal of Medical Virology* 80: 1102-1108, 2009
- 2) Saijo M, Ami Y, Suzaki Y, Nagata N, Iwata, N, Hasegawa H, Iizuka I, Shiota T, Sakai K, Ogata M, Fukushi S, Mizitani T, Sata T, Kurata T, Kurane I, Morikawa S. Virulence and pathophysiology of the Congo Basin and West African strains of monkeypox virus in nonhuman primates. *Journal of General Virology* 90: 2266-2271, 2009
 - 3) Nakauchi M, Fukushi S, Saijo M, Mizutani T, Ure AE, Romonowski V, Kurane I, Morikawa S. Characterization of monoclonal antibodies to Junin virus nucleocapsid protein and application to the diagnosis of hemorrhagic fever caused by South American arenaviruses. *Clinical and Vaccine Immunology* 16: 1132-1138, 2009
 - 4) Saijo M. Emerging and re-emerging infection threats to society. *Journal of Disaster Research* 4: 291-297, 2009
 - 5) Saijo M, Morikawa S, Kurane I. Diagnostic systems for viral hemorrhagic fevers and emerging viral infections prepared in the National Institute of Infectious Diseases. *Journal of Disaster Research* 4: 315-321, 2009
 - 6) Morimoto K, Saijo M. Imported rabies cases and preparedness for rabies in Japan. *Journal of Disaster Research* 4: 346-357, 2009
 - 7) Yagi T, Hattori H, Ohira M, Nakamichi K, Takayama-Ito M, Saijo M, Shimizu T, Ito D, Takahashi K, Suzuki N. Progressive multifocal leukoencephalopathy developed in incomplete Heerfordt syndrome, a rare manifestation of sarcoidosis, without steroid therapy responding to cidofovir. *Clinical Neurology and Neurosurgery* (in press)
 - 8) Nakamichi K, Kitani, Takayama-Ito M, Morimoto K, Kurane I, Saijo M. Celastrol suppresses morphological and transcriptional responses in microglial cells upon stimulation with double-stranded RNA. *International Journal of Neuroscience* (in press)
- ## 2. 学会発表
- 1) 塩田智之, 森川茂, 飯塚愛恵, 倉根一郎, 西條政幸. 293T細胞を用いたHSV-1組換えチミジンリン酸化酵素の発現と薬剤感受性試験への応用. 第19回日本抗ウイルス療法研究会, 東京, 2009.6
 - 2) Bukbuk DN, Saijo M, Georges-Courbot MC, Marianneau P, George A, Shuetsu F, Mizutani T, Kurata T, Kurane I, Morikawa S. Recombinant nucleocapsid protein-based diagnosis of and seroepidemiological study on Lassa fever. The 109th ASM General Meeting, Philadelphia, PA, 2009.5
 - 3) Saijo M, Ami Y, Suzaki Y, Nagata N, Iwata N, Hasegawa H, Ogata M, Iizuka I, Shiota T, Fukushi S, Mizutani T, Sata T, Kurata T, Kurane I, Morikawa S. Pathology of monkeypox in nonhuman primates leading to the difference in virulence between Congo Basin and West African strains. 43rd Annual Meeting of the US-Japan Cooperative Medical Science Program and Special Minisymposium on enterovirus 71,

- Philadelphia, PA, 2009.7
- 4) 西條政幸, 網至康, 須崎百合子, 永田典代, 長谷川秀樹, 新村靖彦, 横手公幸, 飯塚愛恵, 塩田智之, 佐多徹太郎, 倉田毅, 倉根一郎, 森川茂. 痘そうワクチン LC16m8 および *Lister* 株免疫時における IMV および EEV 蛋白に対する抗体応答とサル痘予防効果. 第 13 回日本ワクチン学会学術総会, 札幌, 2009.9
 - 5) 中道一生, 伊藤陸代, 奴久妻聡一, 森本金次郎, 倉根一郎, 西條政幸. 脳脊髄液中の JC ポリオーマウイルスを検出するためのリアルタイム PCR 検査系の確立と進行性多巣性白質脳症 (PML) の診断支援. 第 57 回日本ウイルス学会学術集会, 東京, 2009.10
 - 6) 酒井宏治, 永田典代, 岩田奈織子, 長谷川秀樹, 松井珠乃, 網至康, 平井理香, 須崎百合子, 水谷哲也, 福士秀悦, 緒方もも子, 西條政幸, 藤本嗣人, 山田靖子, 岡部信彦, 佐多徹太郎, 倉根一郎, 森川茂. 第 57 回日本ウイルス学会学術集会, 東京, 2009.10
 - 7) 永田典代, 岩田奈織子, 長谷川秀樹, 西條政幸, 森川茂, 佐藤由子, 佐多徹太郎. SARS-CoV 感染動物における宿主 Th1/Th2 バランスと重症化の関連. 第 57 回日本ウイルス学会学術集会, 東京, 2009.10
 - 8) 塩田智之, 飯塚愛恵, 森川茂, 倉根一郎, 水口雅, 西條政幸. 293T 細胞を用いた単純ヘルペスウイルスならびに水痘帯状疱疹ウイルス組換えチミジンリン酸化酵素の発現と薬剤感受性試験への応用. 第 57 回日本ウイルス学会学術集会, 東京, 2009.10
 - 9) 森川茂, 福士秀悦, 酒井宏治, 永田典代, 長谷川秀樹, 松井珠乃, 水谷哲也, 平井理香, 網至康, 緒方もも子, 西條政幸, 山田靖子, 岡部信彦, 佐多徹太郎, 倉根一郎. カニクイザルの致死的イヌジステンパーウイルス感染事例の解析. 第 57 回日本ウイルス学会学術集会, 東京, 2009.10
 - 10) 飯塚愛恵, 塩田智之, 西條政幸, 福士秀悦, 水谷哲也, 緒方もも子, 倉根一郎, 水口雅, 森川茂. 痘そうワクチン LC16m8 株の温度感受性に関する解析. 第 57 回日本ウイルス学会学術集会, 東京, 2009.10
 - 11) 水谷哲也, 前田健, 渡辺俊平, 久和茂, 吉川泰弘, 明石博臣, 中内美名, 酒井宏治, 福士秀悦, 緒方もも子, 西條政幸, 倉根一郎, 森川茂. ウイルスの網羅的検出法 (RDV 法 ver 3.1) を用いたコウモリ由来新規 β ヘルペスウイルスの同定. 第 57 回日本ウイルス学会学術集会, 東京, 2009.10
 - 12) 中内美名, 福士秀悦, 水谷哲也, 緒方もも子, 西條政幸, 倉根一郎, Austin Ure, Victor Romanowski, 森川茂. 南米出血熱の実験室診断法の開発. 第 57 回日本ウイルス学会学術集会, 東京, 2009.10
 - 13) 中道一生, 伊藤陸代, 奴久妻聡一, 森本金次郎, 倉根一郎, 西條政幸. 定位微量投与系を用いたマウスポリオーマウイルスの脳における持続感染様式の解析. 第 57 回日本ウイルス学会学術集会, 東京, 2009.10
 - 14) 岩田奈織子, 永田典代, 辻隆裕, 長谷川秀樹, 佐藤由子, 横田恭子, 水谷哲也, 西條政幸, 森川茂, 佐多徹太郎. SARS-CoV 感染動物モデルを用いた UV 不活化 SARS-CoV の免疫効果と副作用について. 第 57 回日本ウイルス学会学術集会, 東京, 2009.10
 - 15) 佐山勇輔, 福士秀悦, 斎藤麻理子, 飯塚愛恵, 水谷哲也, 緒方もも子, 西條政幸, 鈴木陽, 神垣太郎, 玉記雷太, 倉根一郎, 押谷仁, 森川茂. フィリピンのレストンエボラウイルス感染症のウイルス遺伝子解析と感染状況の実態調査. 第 57 回日本ウイルス学会学術集会, 東京, 2009.10