

36. 白土東子、熊谷安希子、伊藤浩美、古川早苗、成松 久、石井孝司、染谷雄一、脇田隆宇、久保田智巳：X 線結晶構造解析によるノロウイルスと血液型抗原の結合解析、第 58 回日本ウイルス学会、平成 22 年 1 月、徳島
37. 鈴木亮介、斎藤憲司、赤澤大輔、石井孝司、松浦善治、脇田隆宇、鈴木哲朗：C 型肝炎ウイルスの *trans*-packaging 型粒子を用いた感染機構の解析、第 58 回日本ウイルス学会、平成 22 年 1 月、徳島
38. Ishii K. Surveillance of hepatitis A virus in Japan. Research Forum for the Tohoku-RITM Collaborating Research Center for Emerging and Reemerging Infectious Diseases. Manila, Philippines, December 10, 2010.
39. Li T.C., Liu R., Yoshizaki S., Ishii K., Miyamura T., Takeda N. and Wakita T. The stability and inactivation of hepatitis E virus grown in cell culture. 9th International Symposium on Positive-Strand RNA Viruses, Atlanta, USA, May 17-22, 2010.
40. Suzuki R., Akazawa D., Ishii K., Matsuura Y., Wakita T. and Suzuki T. Use of trans-complemented hepatitis C virus particles for study of viral entry process. 9th International Symposium on Positive-Strand RNA Viruses, Atlanta, USA, May 17-22, 2010.
41. 明里宏文：C 型肝炎と HIV 感染症 (AIDS) 第 57 回日本実験動物学会シンポジウム (京都) 平成 22 年 5 月 12-14 日
42. Hirofumi Akari: Novel non-human primate models for hepatitis C and AIDS. 2010 KALAS international symposium (Korea, Busan), August 19-21, 2010
43. 明里宏文：HCV, HIV の新規霊長類モデル開発 大阪大学微生物病研究所セミナー (大阪) 平成 22 年 8 月 26 日
44. 明里宏文：C 型肝炎の新規霊長類モデル開発 第 47 回日本ウイルス学会九州支部総会 (宮崎) 平成 22 年 9 月 3-4 日
45. Hirofumi Akari: A novel monkey-tropic HIV-1: toward the development of a new non-human primate model. 11th Kumamoto AIDS seminar (Kumamoto) October 6-8, 2010
46. 明里宏文：HIV-1 感染霊長類モデルの開発 第 58 回日本ウイルス学会シンポジウム (徳島) 平成 22 年 1 月 7-9 日
47. 土肥直哉、齊藤暁、明里宏文、藤原佐知、三宅在子、横山勝、大出裕高、佐藤宏徳、足立昭夫、野間口雅子：サル指向性 HIV-1 CA の 1 アミノ酸変異はサル細胞での増殖を促進する 第 58 回日本ウイルス学会学術集会 (徳島) 平成 22 年 1 月 7-9 日
48. 齊藤暁、河野健、黒石歩、中山英美、塩田達雄、足立昭夫、野間口雅子、保富康宏、俣野哲朗、明里宏文：カニクイザルにおける第 3 世代サル指向性 HIV-1 の増殖の解析 第 24 回日本エイズ学会学術集会 (東京) 平成 22 年 1 月 24-26 日
49. 野間口雅子、齊藤暁、明里宏文、土肥直哉、藤原佐知、三宅在子、横山勝、大出裕高、佐藤宏徳、足立昭夫：サル細胞で効率良く増殖する HIV-1 の構築—アカゲザル TRIM5 $\alpha$  と tetherin による抑制の回避— 第 24 回日本エイズ学会学術集会 (東京) 平成 22 年 1 月

- 月 24-26 日
50. 齊藤暁、河野健、黒石歩、中山英美、塩田達雄、足立昭夫、野間口雅子、保富康宏、俣野哲朗、明里宏文：カニクイザルにおける第3世代サル指向性 HIV-1 の増殖の解析 第24回日本エイズ学会学術集会（東京）平成22年11月24-26日
  51. Matsumoto M, Watanabe A, Seya T.: Raftlin is essential for poly(I:C) cellular uptake in human myeloid dendritic cells. **Keystone symposia**, 2011. 2.13-16.
  52. Oshiumi H, Matsumoto M, Seya T.: Riplet ubiquitin ligase is essential for RIG-I dependent type I interferon production. **Keystone symposia**, 2011. 2.13-16.
  53. Seya T, Shime H, Azuma M, Matsumoto M.: RNA adjuvants that induce multiple effectors by dendritic cells for facilitating antitumor immunity. **Keystone symposia**, 2011. 2.13-16.
  54. Watanabe A, Seya T, Matsumoto M.: Identification of a novel protein that participates in poly(I:C) cellular uptake. **14<sup>th</sup> International Congress of Immunology**. 2010.8.22-27.
  55. Tatematsu M, Seya T, Matsumoto M.: Identification of Leu194 as a key residue of Toll/IL-1 receptor domain-containing adaptor molecule-1-mediated IRF-3 activation. **14<sup>th</sup> International Congress of Immunology**. 2010.8.22-27.
  56. 脇田隆宇, 「C型肝炎ウイルスのウイルス培養系とその応用」第28回広島山口肝疾患研究会、リーガロイヤル広島（2009, 4.4）
  57. 脇田隆宇, 「C型肝炎ウイルスの基礎研究結果について」、第165回袋井病診カンファレンス、袋井市民病院（2009, 4.20）
  58. 脇田隆宇, 「C型肝炎ウイルスの基礎研究と新規治療法開発」、Hep C Forum 2009 KANAZAWA、石川県文教会館ホール（2009, 6.13）
  59. 脇田隆宇, 「C型肝炎ウイルスの基礎研究の進歩」、第12回臨床肝臓研究会、ザ・ナハテラス（2009, 9.25）
  60. 脇田隆宇, 「C型肝炎ウイルスの複製増殖に関する話題」、第6回京滋ウイルス性肝炎研究会、ホテルグランヴィア京都（2010, 2.6）
  61. 脇田隆宇, 「C型肝炎ウイルスの基礎研究の進歩とその応用」、第6回九州C型肝炎研究会、ホテル日航福岡（2010, 2.20）
  62. 相崎英樹、脇田隆宇、感染性 HCV 粒子形成における宿主生体膜の役割、第45回日本肝臓学会総会、神戸ポートピアホテル、（2009, 6.4-5）、シンポジウム1「C型慢性肝炎における宿主とウイルスの interaction」
  63. 加藤孝宣、伊達朋子、脇田隆宇、C型肝炎ウイルスの生体内での感染様式と培養細胞での増殖能、第45回日本肝臓学会総会、神戸ポートピアホテル、（2009, 6.4-5）、ワークショップ3「C型肝炎の基礎と臨床」
  64. 脇田隆宇、肝炎ウイルス基礎研究、第45回日本肝臓学会総会、神戸ポートピアホテル、（2009, 6.4-5）、ハイライトレクチャー
  65. 鈴木哲朗、脇田隆宇、C型肝炎ウイルスの感染粒子形成機構、第13回日本肝臓学会大会、国立京都国際会館、（2009, 10.14-16）、パネルディスカッション13「肝炎ウイルス研究の

- 新展開-新しい治療戦略を目指して」
66. 相崎英樹、後藤耕司、山本真民、佐藤慈子、高橋信弘、深澤征義、花田賢太郎、松浦善治、宮村達男、脇田隆宇、鈴木哲朗、HCV 粒子形成に關与する脂肪滴周辺膜蛋白の同定、日本ウイルス学会第 5 7 回学術集会、都市センターホテル(2009, 10.25-27)、ワークショップ7 ウイルス粒子形成
  67. 石橋真理子、鶴田浩一、山口裕美、藤田順一、田中輝明、清水洋子、脇田隆宇、鈴木操、江角真理子、肝臓類洞内皮 C 型レクチン L-SIGN 発現系を用いた C 型肝炎ウイルス粒子 JFH1 の感染実験、日本ウイルス学会第 5 7 回学術集会、都市センターホテル(2009, 10.25-27)
  68. 鈴木亮介、齋藤憲司、安東友美、石井孝司、松浦善治、宮村達男、脇田隆宇、鈴木哲朗、C 型肝炎ウイルスの *trans-packaging* 系を用いた NS2 蛋白質の感染性粒子形成における機能解析、日本ウイルス学会第 5 7 回学術集会、都市センターホテル(2009, 10.25-27)
  69. 渡邊則幸、村山麻子、赤澤大輔、朝長充則、伊達朋子、加藤孝宣、鈴木哲朗、脇田隆宇、HCV E2 タンパク質の糖鎖機能の解析、日本ウイルス学会第 5 7 回学術集会、都市センターホテル(2009, 10.25-27)
  70. 赤澤大輔、森山正樹、尾見法昭、中村紀子、鈴木哲朗、石井孝司、脇田隆宇、培養細胞由来 HCV 粒子ワクチンの免疫による異なる遺伝子型 HCV 感染阻害活性の誘導、日本ウイルス学会第 5 7 回学術集会、都市センターホテル(2008, 10.25-27)
  71. 山本真民、相崎英樹、宮村達男、濱野國勝、脇田隆宇、鈴木哲朗、C 型肝炎ウイルス粒子形成、感染性に重要なコレステロール構造の解析、日本ウイルス学会第 5 7 回学術集会、都市センターホテル(2009, 10.25-27)
  72. 久島透嘉、脇田隆宇、土方 誠、core の変異体を用いた C 型肝炎ウイルスの粒子形成機構の解析、日本ウイルス学会第 5 7 回学術集会、都市センターホテル(2009, 10.25-27)
  73. 有海康雄、黒木美沙緒、牧正敏、池田正徳、團迫浩方、脇田隆宇、加藤宜之、ESCRT 小胞輸送系の HCV 産生への關与、日本ウイルス学会第 5 7 回学術集会、都市センターホテル(2009, 10.25-27)
  74. 赤澤大輔、森山正樹、尾見法昭、中村紀子、鈴木哲朗、石井孝司、脇田隆宇、培養細胞由来 HCV 粒子ワクチンの免疫による異なる遺伝子型 HCV 感染阻害活性の誘導、日本ウイルス学会第 5 7 回学術集会、都市センターホテル(2009, 10.25-27)
  75. 谷田以誠、深澤征義、脇田隆宇、花田賢太郎、オートファジーは HCV 粒子産生に關与している、日本ウイルス学会第 5 7 回学術集会、都市センターホテル(2009, 10.25-27)
  76. 森山正樹、赤澤大輔、尾見法昭、中村紀子、鈴木哲朗、石井孝司、脇田隆宇、培養細胞由来 HCV 粒子を用いたワクチンの免疫誘導能および最適アジュバントの検討、日本ウイルス学会第 5 7 回学術集会、都市センターホテル(2009, 10.25-27)
  77. Wakita T. HCV cell culture system. Asian Pacific Digestive Week (APDW2009) Taipei, Taiwan (2009, 9. 29)
  78. Wakita T. HCV cell culture system and antiviral

- development. International Symposium on Hepatocellular Carcinoma, Kagoshima University Faculty of Medicine, Kagoshima, Japan (2010, 2. 19)
79. Yamamoto M, Aizaki H, Goto K, Hamano K, Miyamura T, Wakita T, Suzuki T. Structural requirements of virion-associated cholesterol for HCV morphogenesis and infectivity, 16th International Meeting on HCV and Related Viruses, Nice, France, October 3-7, 2009
  80. Aizaki H, Yamamoto M, Goto K, Fukasawa M, Hanada K, Sato S, Takahashi N, Matsuura Y, Miyamura T, Wakita T, Suzuki T. Identification of lipid droplet-associated membrane proteins that are involved in HCV production, 16th International Meeting on HCV and Related Viruses, Nice, France, October 3-7, 2009
  81. Watanabe N, Aizaki H, Matsuura T, Wakita T, Suzuki T. HCV subgenomic replicon replication in human hepatic stellate cell lines. 16th International Meeting on HCV and Related Viruses, Nice, France, October 3-7, 2009
  82. Ariumi Y, Kuroki M, Maki M, Ikeda M, Dansako H, Wakita T, Kato N. The ESCRT pathway is required for HCV production. 16th International Meeting on HCV and Related Viruses, Nice, France, October 3-7, 2009
  83. Carpenter A, Podevin P, Pene V, Aoudjehane L, Carriere M, Saidi S, Hernandez C, Meritet JF, Scatton O, Dreux M, Cosset F, Bartenschlager R, Wakita T, Conti F, Calmus Y, Rosenberg AR. HCV grown in primary human hepatocytes has higher specific infectivity and lower buoyant density than HCV grown in Huh-7 cell line. 16th International Meeting on HCV and Related Viruses, Nice, France, October 3-7, 2009
  84. Saulnier A, Groult G, Ghibaud D, Wakita T, Cohen L, Marnata C, Martin A. Analysis of particle assembly from chimeric HCV JFH-1 genomes expressing E1-E2-p13 of GB virus B. 16th International Meeting on HCV and Related Viruses, Nice, France, October 3-7, 2009
  85. Arnaud N, Dabo S, Maillard P, Budkowska A, Garcin D, Gatignol A, Wakita T, Meurs E. HCV induces IFN at the early steps of infection. 16th International Meeting on HCV and Related Viruses, Nice, France, October 3-7, 2009
  86. Suzuki R, Saito K., Ando T., Ishii K., Matsuura Y., Miyamura T., Wakita T and Suzuki T. Plasmid-based production of trans-complemented HCV particles: its use for functional analysis of NS2. 16th International Meeting on HCV and Related Viruses, Nice, France, October 3-7, 2009
  87. Shoji I., Abe K., Murakami K., Ishii K., Suzuki T., Wakita T, Miyamura T., Koike K. and Hotta H. The hnRNP H1 modulates production of HCV particles through interaction with HCV core protein. 16th International Meeting on HCV and Related Viruses, Nice, France, October 3-7, 2009
  88. Yoshida T., Iwasaki Y., Mori K., Maki N., Ishii K., Iijima S., Yoshizaki S., Katakai Y., Suzuki T., Miyamura T. and Akari H. Selective and frequent non-synonymous mutations of the viral genome in chronically GBV-B-infected marmosets. 16th

International Meeting on HCV and Related Viruses, Nice, France, October 3-7, 2009

89. Akari H., Iwasaki Y., Mori K., Maki N., Ishii K., Iijima S., Yoshida T., Yoshizaki S., Suzuki T. and Miyamura T. Characterization of chronic GBV-B infection in marmosets: selective and frequent nonsynonymous mutations of the viral genome. 9th Awaji International Forum on Infection and Immunity, Awaji, Japan, September 8-11, 2009
90. 熊谷安希子、久保田智巳、伊藤浩美、成松久、石井孝司、染谷雄一、脇田隆字、白土東子：X線結晶構造解析によるノロウイルスと血液型抗原の結合解析、第57回日本ウイルス学会、平成21年10月、東京
91. 勝二郁夫、阿部克俊、村上恭子、石井孝司、鈴木哲朗、脇田隆字、宮村達男、小池和彦、堀田博：C型肝炎ウイルス増殖における宿主因子 hnRNP H1/H2/F の役割、第57回日本ウイルス学会、平成21年10月、東京
92. 大西和夫、清原知子、石井孝司、小林和夫：HAV 特異的モノクローナル抗体を用いた ELISA 検出系の最適化と HAV 抗体産生 B 細胞動態解析法の検討、第57回日本ウイルス学会、平成21年10月、東京
93. 熊谷安希子、久保田智巳、伊藤浩美、成松久、脇田隆字、石井孝司、染谷雄一、白土東子：X線結晶構造解析によるノロウイルスと血液型抗原の結合解析、第29回日本糖質学会、平成21年8月、高山
94. 岩崎優紀、森 健一、榎 昇、石井孝司、飯島沙幸、吉田友教、吉崎佐矢香、片貝祐子、鈴木哲朗、宮村達男、明里宏文：C型肝炎サロゲート霊長類モデル：GBV-B 長期持続感染サルのウイルスゲノム解析、第45回日本肝臓学会総会、平成21年6月、神戸
95. 岩崎優紀、森 健一、榎 昇、石井孝司、飯島沙幸、吉田友教、吉崎佐矢香、片貝祐子、鈴木哲朗、神奈木真理、宮村達男、明里宏文：マーマセットを用いた C 型肝炎サロゲートモデルの開発、第56回実験動物学会総会、平成21年5月、大宮
96. 森 健一、深井浩未、明里宏文、田中榮司、榎 昇：HCV 動物モデルの樹立に向けて（HCV/GBV-B キメラウイルス）第45回日本肝臓学会総会（神戸）平成21年6月
97. 深井浩未、森 健一、岩崎優紀、吉田友教、明里宏文、田中榮司、榎 昇：C型肝炎ウイルス動物モデル（HCV/GBV-B キメラウイルス）第57回ウイルス学会（東京）平成21年10月
98. Matsumoto M., Itoh H, and Seya T.,: The TIR domain determines cellular localization of human Toll-like receptor 8, (Osaka) Immune Regulation: Present and Future, 2009.5.25-27
99. 宮下萌子、押海裕之、松本美佐子、瀬谷 司：RNA ウイルスに対する自然免疫応答に関する新たな DEAD box 型ヘリケース DDX60 の機能解析、第74回日本インターフェロン・サイトカイン学会学術集会（京都）、2009.6.26-27
100. 3. 押海裕之、松本美佐子、瀬谷 司：自然免疫系で働く DDX3 分子を C 型肝炎ウイルスのコア蛋白質が阻害し、I 型インターフェロン産生を抑制する新たな仕組み、第57回日

- 本ウイルス学会学術集会（東京）、  
2009.10.25-27（口頭）
101. 海老原敬、松本美佐子、瀬谷 司：HCV 感染による TLR3 経路の活性化と NK 細胞の誘導、第57回日本ウイルス学会学術集会(東京)、2009.10.25-27（ワークショップ）
  102. Azuma M., Ebihara T., Kubota N., Matsumoto M., and Seya T.: Regulation of crosspresentation through the TLR3/TICAM-1 pathway in mDC, 第39回日本免疫学会総会・学術集会(大阪)、2009.12.2-4
  103. Tatematsu M., Watanabe A., Oshiumi H., Seya T., Matsumoto M.: Structural and functional analysis of TICAM-1, 第39回日本免疫学会総会・学術集会(大阪)、2009.12.2-4（口頭）
  104. 渡部綾子、瀬谷 司、松本美佐子：Analysis of the uptake protein for double-stranded RNA, 第39回日本免疫学会総会・学術集会(大阪)、2009.12.2-4（口頭）
  105. Wakita T., HCV replication and virus particle formation, The 8<sup>th</sup> Awaji International Forum on Infection and Immunity, The Hyogo Prefecture Awaji Yumebutai International Conference Center, (2008 9/7-11)
  106. Wakita T., Development of HCV culture system, Workshop/Hepatitis, The 7<sup>th</sup> Japan-China International Conference of Virology, Tokyo, Japan (June 1-3, 2008)
  107. Wakita T., Hepatitis C virus replication and virus particle formation, Symposium: Emerging Viruses and the Control of Viruses, XIVth International Congress of Virology, IUMS 2008. 8.15, Istanbul, Turkey
  108. Aizaki H., Morikawa K., Fukasawa M., Hara H., Suzuki R., Tani H., Hanada K., Matsuura Y., Lai MMC., Miyamura T., Wakita T., Suzuki T. Critical roles of virion-associated cholesterol and sphingolipids in the viral infectivity, IUMS 2008. 8.15, Istanbul, Turkey
  109. Murakami K, Wakita T. et al. Identification of hnRNPH1 as a binding partner of hepatitis C virus core protein and the IRES IIIId region of viral RNA, IUMS 2008. 8.15, Istanbul, Turkey
  110. Saeed M., Kato T., Wakita T. In vitro replication efficiencies of hepatitis C virus JFH-1 strain with mutations emerged in chimpanzee, The Hyogo Prefecture Awaji Yumebutai International Conference Center, (2008 9/7-11)
  111. Takahashi H, Omi N, Akazawa D, Nakamura N, Mochizuki H, Suzuki T, Wakita T. Biological properties of purified recombinant HCV particles with the epitope-tagged envelope, 15th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. San Antonio TX, USA (2008, 10. 5-9)
  112. Uenishi R, Hakamata W, Nohtomi K, Liao H, Hase S, Suzuki T, Wakita T., Takebe Y. Identification of novel Small molecule HCV entry inhibitor that acts through CD81, 15th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. San Antonio TX, USA (2008, 10. 5-9)
  113. Munakata T, Wakita T., Nomoto A. Induction of hepatic TLR3 by E2F1 during hepatitis C virus infection, 15th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. San Antonio TX, USA (2008, 10. 5-9)
  114. Zeisel MB, Hoffmann M, Jilg N, Stoll-Keller F,

- Wakita T, Barth H, Henneke P, Baumert TF. Sensing of hepatitis C virus core by toll-like receptor 2 is shielded in enveloped viral particles, 15th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. San Antonio TX, USA (2008, 10. 5-9)
115. Hamamoto I., Murakami K., Suzuki T., Taya K., Okabe N., Wakita T, Shoji I. ERGIC-53 regulates the HCV RNA replication through interaction with the viral NS3 protein, 15th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. San Antonio TX, USA (2008, 10. 5-9)
116. Fukasawa M, Nakamura S, Nitahara-Kasahara Y, Shimotohno K, Suzuki T, Wakita T, Nishijima M, Mashino T, Anti-HCV activity of novel Fullerene derivatives, 15th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. San Antonio TX, USA (2008, 10. 5-9)
117. Kato N, Mori K, Abe K, Dansako H, Ariumi Y, Wakita T, Ikeda M, A new human hepatoma cell line enabling persistent reproduction of HCV life cycle and assay for anti-HCV reagents, 15th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. San Antonio TX, USA (2008, 10. 5-9)
118. Akazawa D, Morikawa K, Omi N, Takahashi H, Nakamura N, Mochizuki H, Date T, Wakita T, Production and purification of HCV particles from serum-free culture, 15th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. San Antonio TX, USA (2008, 10. 5-9)
119. Machida R, Tong S, Heintges T, Wakita T, Wands JR, Interruption of hepatitis C virus particle formation by an intracellular antibody targeting the viral core protein, 15th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. San Antonio TX, USA (2008, 10. 5-9)
120. Ishii K, Murakami K, Hmwe SS, Li J, Suzuki R, Miyamura T, Wakita T, Suzuki T, Trans-encapsidation of HCV subgenomic replicon RNA with viral structure proteins, 15th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. San Antonio TX, USA (2008, 10. 5-9)
121. Ariumi Y, Kuroki M, Ikeda M, Dansako H, Wakita T, Kato N, The vacuolar protein sorting pathway is essential for HCV budding, 15th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. San Antonio TX, USA (2008, 10. 5-9)
122. Masaki T, Suzuki R, Murakami K, Aizaki H, Ishii K, Miyamura T, Wakita T, Suzuki T, The C-terminal serine cluster of NS5A is a determinant of NS5A-core protein interaction and HCV production, 15th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. San Antonio TX, USA (2008, 10. 5-9)
123. Watanabe N, Murayama A, Akazawa D, Tomonaga M, Date T, Kato T, Suzuki T, Wakita T, Purification and structural analysis of HCV E2 protein, 15th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. San Antonio TX, USA (2008, 10. 5-9)
124. Angus AGN, Dalrymple DA, Boulant S, McGivern DR, Wakita T, McLauchlan J, Lemon SM, Patel AH, Hepatitis C virus replication does not depend on the interaction between the viral

- core protein and the cellular RNA helicase DDX3, 15th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. San Antonio TX, USA (2008, 10. 5-9)
125. Shin K-S, Lim Y-S, Choi S-H, Wakita T, Hwang SB, Regulation of heat shock protein 70 by hepatitis c virus NS5A protein, 15th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. San Antonio TX, USA (2008, 10. 5-9)
126. Abe K, Murakami K, Takamiya S, Suzuki T, Miyamura T, Koike K, Wakita T, Shoji I, Identification of hnRNPH1 and hnRNPF as binding partners for HCV core protein, 15th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. San Antonio TX, USA (2008, 10. 5-9)
127. Abe K, Ikeda M, Ariumi Y, Dansako H, Wakita T, Kato N, Cyclophilins A and B mediate the anti-HCV activity of cyclosporine A in 1b/2a chimeric replicon-harboring cells, 15th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. San Antonio TX, USA (2008, 10. 5-9)
128. Kuroki M, Ariumi Y, Ikeda M, Dansako H, Wakita T, Kato N, Arsenic trioxide inhibits HCV RNA replication through modulation of oxidative stress, 15th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. San Antonio TX, USA (2008, 10. 5-9)
129. Murayama A, Date T, Akazawa D, Kato T, Suzuki T, Nomoto A, Wakita T, A single amino acid mutation in core region is important for efficient infectious virus particle production in genotype 2b/2a chimeric HCV, 15th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. San Antonio TX, USA (2008, 10. 5-9)
130. Seronello S, Ito C, Wakita T, Choi J, Ethanol enhances hepatitis c virus replication in human hepatoma cells supporting infectious virus production, 15th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. San Antonio TX, USA (2008, 10. 5-9)
131. Shoji I, Osaki M, Murakami K, Suzuki T, Miyamura T, Wakita T, Hotta H, Ubiquitylation signal of hepatitis C virus core protein, 15th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. San Antonio TX, USA (2008, 10. 5-9)
132. Sir D, Chen W-L, Wakita T, Yen TSB, Ou J-HJ, Perturbation of autophagic response by hepatitis c virus, 15th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. San Antonio TX, USA (2008, 10. 5-9)
133. Hara H, Aizaki H, Matsuda M, Murakami K, Shoji I, Miyamura T, Wakita T, Suzuki T, Involvement of creatine kinase B in hepatitis C virus genome replication through interaction with the viral NS4A protein, 15th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. San Antonio TX, USA (2008, 10. 5-9)
134. Morikawa K, Akazawa D, Imawari M, Wakita T. The structural analysis of highly purified infectious HCV particles produced in cultured cells. The 59<sup>th</sup> Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases, San Francisco, CA, USA (October 31-November 4,



- 2006)
135. Mishima K, Sakamoto N, Sekine-Osajima Y, Nakagawa M, Itsui Y, Tasaka M, Nishimura-Sakurai Y, Suda G, Onuki Y, Yamamoto M, Wakita T, Watanabe M, Establishment and genetic analysis of cytopathogenic HCV-JFH1 mutants by plaque-forming assay. The 59<sup>th</sup> Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases, San Francisco, CA, USA (October 31-November 4, 2006)
  136. Kato T, Choi Y, Elmowalid G, Sapp RK, Barth H, T Wakita, Krawczynski K, Liang TJ. Hepatitis C virus JFH-1 strain infection in chimpanzee is associated with low pathogenicity and emergence of an adaptive mutation. The 59<sup>th</sup> Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases, San Francisco, CA, USA (October 31-November 4, 2006)
  137. Machida R, Tong S, Heintges T, Wakita T, Wands JR, Li J, Interruption of hepatitis C virus particle formation by an intracellular antibody targeting the viral core protein. The 59<sup>th</sup> Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases, San Francisco, CA, USA (October 31-November 4, 2006)
  138. Omi N., Akazawa D., Takahashi H., Morikawa K., Date T., Ishii K., Suzuki T. and Wakita T. Inactivated recombinant HCV particle (JFH1 strain) immunization of mice could induce antibody response. 2nd Vaccine Congress, Boston, December 7-9, 2008
  139. Ishii K. Highly attenuated vaccinia virus DIs as a potential SARS vaccine. Novel Strategies for Viral Infection Control. Taipei, Taiwan, November 1, 2008
  140. Li T.C., Ishii K. and Takeda N. Challenges in creating a vaccine to prevent hepatitis E. The Forum of the Network of Research Centers on Infectious Diseases, Hanoi, Viet Nam, October 6, 2008
  141. Ishii K., Hasegawa H., Nagata Y., Ami Y., Fukushi S., Taguchi F. and Tsunetsugu-Yokota Y. SARS-CoV Spike-reactive neutralizing antibody is highly effective for the protection of mice in the murine SARS model. XIth International Symposium on Nidoviruses, Oxford, UK, June 22-27. 2008
  142. Ami Y., Ishii K., Tsunetsugu-Yokota Y., Nagata Y., Hasegawa H. and Taguchi F. Fatal exacerbated pneumonia of mice induced by co-infection of respiratory bacterium and SARS-CoV. XIth International Symposium on Nidoviruses, Oxford, UK, June 22-27. 2008
  143. Kato T, Choi YK, Elmowalid G, Sapp RK, Barth H, Wakita T, Krawczynski K, Liang TJ. Hepatitis C virus JFH-1 strain infection in chimpanzees is associated with low pathogenicity and emergence of an adaptive mutation. The 59th Annual Meeting of The American Association for The Study of Liver Diseases. San Francisco, CA, USA. (2008, Oct. 31 – Nov. 4).
  144. 脇田隆宇, 「C型肝炎ウイルス研究の進展:ウイルス増殖からワクチン開発へ」、第134回日本医学会シ

- ンポジウム「感染症をめぐる最近の話題」、日本医師会館、(2008, 7. 17)
145. 森川賢一、脇田隆宇、培養細胞で作製した感染性 C 型肝炎ウイルス粒子の免疫原性の解析およびワクチン応用への可能性、第 4 4 回日本肝臓学会総会、愛媛県県民文化会館、(2008, 6.5-6)、ワークショップ 7 「肝炎ウイルスの感染・複製・排除のメカニズム」
146. 加藤孝宣、三代俊治、脇田隆宇、HCV JFH-1 株のチンパンジーへの感染実験：in vivo 適応変異の機能的解析、第 4 4 回日本肝臓学会総会、愛媛県県民文化会館、(2008, 6.5-6)、ワークショップ 7 「肝炎ウイルスの感染・複製・排除のメカニズム」
147. 脇田隆宇、C 型肝炎ウイルス研究の最先端、第 1 2 回日本肝臓学会大会、グランドプリンスホテル新高輪、(2008, 10.1)、シンポジウム 1 「肝炎ウイルス研究のカットニングエッジ：基礎から臨床への贈り物」
148. 脇田隆宇、ウイルス培養系を用いた C 型肝炎ウイルス研究、日本ウイルス学会第 5 6 回学術集会、岡山コンベンションセンター(2008, 10.26-28)、シンポジウム 4 C 型肝炎
149. 原弘道、相崎英樹、松田麻美、村上恭子、勝二郁夫、松浦善治、宮村達男、脇田隆宇、鈴木哲朗、creatine kinase B は C 型肝炎ウイルス NS4A との相互作用によりウイルスゲノム複製複合体へ運ばれエネルギー供給に働く、日本ウイルス学会第 5 6 回学術集会、岡山コンベンションセンター(2008, 10.26-28)、ワークショップ 2 ウイルス複製機構
150. 政木隆博、鈴木亮介、村上恭子、相崎英樹、石井孝司、村山麻子、伊達朋子、松浦善治、宮村達男、脇田隆宇、鈴木哲朗、HCV 粒子形成における NS5A 蛋白の役割、日本ウイルス学会第 5 6 回学術集会、岡山コンベンションセンター(2008, 10.26-28)、ワークショップ 6 ウイルス侵入・粒子機構
151. 山下篤哉、松本武久、高谷大輔、上條加寿恵、前川伸哉、雨宮史武、坂本直哉、脇田隆宇、梅山秀明、横山茂之、榎本信幸、伊藤正彦、In silico screening による HCV NS3 プロテアーゼ阻害化合物の検索、日本ウイルス学会第 5 6 回学術集会、岡山コンベンションセンター(2008, 10.26-28)、ワークショップ 8 ウイルス感染症の診断と治療
152. 脇田隆宇、C 型肝炎ウイルスのウイルス培養とワクチン開発、第 67 回日本癌学会学術総会、名古屋国際会議場(2008, 10. 28-30)、シンポジウム 4 ウイルス発癌
153. 有海康雄、黒木美沙緒、團迫浩方、阿部健一、池田正徳、脇田隆宇、加藤宜之、ATM DNA 損傷センサーは C 型肝炎ウイルスの RNA 複製に必要である、第 67 回日本癌学会学術総会、名古屋国際会議場(2008, 10. 28-30)、ワークショップ 3-4 HCV
154. 政木隆博、鈴木亮介、村上恭子、相崎英樹、石井孝司、宮村達男、脇田隆宇、鈴木哲朗、HCV の粒子形成における NS5A 蛋白の役割、第 4 4 回日本肝臓学会総会、愛媛県県民文化会館、(2008, 6.5-6)
155. 平賀伸彦、今村道雄、木村俊之、畠山剛、光井富喜子、三木大樹、森奈美、柘植雅貴、高橋祥一、脇田隆宇、茶山一彰、HBV と HCV はインターフェロン感受性が異なる-ウイル

- ス複製培養細胞および動物モデルを用いた検討-、第44回日本肝臓学会総会、愛媛県県民文化会館、(2008, 6.5-6)
156. 脇田隆宇、「C型肝炎ウイルスの細胞内粒子形成過程の解析」「感染現象のマトリックス」横糸の会、東京大学医科学研究所(2008, 5.29-30)
157. 相崎英樹、脇田隆宇、「C型肝炎ウイルスの生活環における脂質の役割に関する研究」「感染現象のマトリックス」横糸の会、兵庫医科大学(2008, 6.28-29)
158. 加藤宜之、森京子、阿部健一、團迫浩方、有海康雄、脇田隆宇、池田正徳、新しいヒト肝癌細胞株 Li23 を用いた HCV 生活環再現システム、日本ウイルス学会第56回学術集会、岡山コンベンションセンター(2008, 10.26-28)
159. 下池貴志、SA Mckenna、DA Lindhout、脇田隆宇、JD. Puglisi、HCV IRES 依存的翻訳は eIF2 のリン酸化耐性である、日本ウイルス学会第56回学術集会、岡山コンベンションセンター(2008, 10.26-28)
160. 有海康雄、黒木美沙緒、團迫浩方、阿部健一、池田正徳、脇田隆宇、加藤宜之、DNA 損傷センサー ATM および Chk2 と HCV NS5B との相互作用、日本ウイルス学会第56回学術集会、岡山コンベンションセンター(2008, 10.26-28)
161. 石井孝司、村上恭子、ススムエー、張斌、李津、白倉雅之、森川賢一、鈴木亮介、宮村達男、脇田隆宇、鈴木哲朗、C型肝炎ウイルスの subgenomic replicon を持つウイルス用粒子の形成と感染性、日本ウイルス学会第56回学術集会、岡山コンベンションセンター(2008, 10.26-28)
162. 棟方翼、脇田隆宇、野本明男、TLR3 は C 型肝炎ウイルス感染を抑制する、日本ウイルス学会第56回学術集会、岡山コンベンションセンター(2008, 10.26-28)
163. 村上恭子、阿部克俊、高宮智史、木村敬朗、鈴木哲朗、宮村達男、小池和彦、脇田隆宇、勝二郁夫、HCV コア蛋白質に結合する新規宿主因子 hnRNPH1/H2 の HCV 生活環における役割、日本ウイルス学会第56回学術集会、岡山コンベンションセンター(2008, 10.26-28)
164. 石橋真理子、脇田隆宇、江角真理子、C型肝炎ウイルス量の多い肝組織に発現亢進する分子 OASL はウイルス制御分子か?、日本ウイルス学会第56回学術集会、岡山コンベンションセンター(2008, 10.26-28)
165. 浜本いつき、村上恭子、鈴木哲朗、多屋馨子、岡部信彦、脇田隆宇、勝二郁夫、C型肝炎ウイルス複製を制御する宿主因子 ERGIC-53 の機能、日本ウイルス学会第56回学術集会、岡山コンベンションセンター(2008, 10.26-28)
166. 黒木美沙緒、有海康雄、池田正徳、團迫浩方、脇田隆宇、加藤宜之、亜ヒ酸は酸化ストレスを介して HCV RNA の複製を顕著に阻害する、日本ウイルス学会第56回学術集会、岡山コンベンションセンター(2008, 10.26-28)
167. 武部豊、上西理恵、納富香子、廖華南、長谷彩希、鈴木哲朗、脇田隆宇、袴田航、CD81 を標的とする新しいクラスの低分子性 HCV エントリー阻害剤の同定、日本ウイルス学会第56回学術集会、岡山コンベンションセンター(2008, 10.26-28)

168. 尾見法昭、赤澤大輔、高橋仁、森川賢一、伊達朋子、石井孝司、鈴木哲朗、脇田隆宇、細胞培養により産生されたキメラ HCV ウイルス株および JFH-1 株の免疫の検討、日本ウイルス学会第 56 回学術集会、岡山コンベンションセンター(2008, 10.26-28)
169. 上西理恵、廖華南、袴田航、納富香子、長谷彩希、赤澤大輔、鈴木哲朗、脇田隆宇、武部豊、HCV JFH-1 infectivity assay を用いた低分子 HCV 阻害剤の探索とその評価、日本ウイルス学会第 56 回学術集会、岡山コンベンションセンター(2008, 10.26-28)
170. 阿部健一、池田正徳、有海康雄、團迫浩方、脇田隆宇、加藤宜之、Cyclosporine A に対し抵抗性を示す 1b/2a キメラレプリコン、日本ウイルス学会第 56 回学術集会、岡山コンベンションセンター(2008, 10.26-28)
171. 渋谷悠子、尾見法昭、中村紀子、脇田隆宇、細胞培養系で作製した C 型肝炎ウイルスにより誘導された抗体の性状解析、第 12 回日本ワクチン学会学術集会、崇城大学市民ホール(2008, 11.8-9)
172. 千代智子、関口敏、松原明弘、保富康宏、脇田隆宇、志田壽利、水野喬介、村井深、小原道法、HCV 遺伝子組換えワクチニアウイルスの作製とワクチンとしての検討、第 12 回日本ワクチン学会学術集会、崇城大学市民ホール(2008, 11.8-9)
173. 勝二郁夫、大崎一直、村上恭子、鈴木哲朗、宮村達男、脇田隆宇、堀田博、C 型肝炎ウイルスコア蛋白質のユビキチン化シグナル、第 31 回日本分子生物学会年会、神戸ポートアイランド(2008. 12.9-12)
174. 相崎英樹、山本真民、原弘道、森川賢一、谷英樹、松浦善治、斎藤恭子、深澤征義、花田賢太郎、宮村達男、脇田隆宇、鈴木哲朗、脂質の C 型肝炎ウイルス感染における役割、第 31 回日本分子生物学会年会、神戸ポートアイランド(2008. 12.9-12)
175. 高橋仁、尾見法昭、赤澤大輔、中村紀子、望月英典、鈴木哲朗、脇田隆宇、エピトープタグを付加した組換え HCV 粒子の効率的な産生と性状解析、第 31 回日本分子生物学会年会、神戸ポートアイランド(2008. 12.9-12)
176. 村上恭子、阿部克俊、高宮智史、木村敬郎、鈴木哲朗、宮村達男、小池和彦、脇田隆宇、勝二郁夫、HCV コア蛋白に結合する新規宿主因子 hnRNP H1/H2 の HCV 生活環における役割、第 31 回日本分子生物学会年会、神戸ポートアイランド(2008. 12.9-12)
177. 石橋真理子、脇田隆宇、清水洋子、江角眞理子、肝臓類洞内皮 C 型レクチン L-SIGN の C 型肝炎ウイルス受容体機能の解析、第 31 回日本分子生物学会年会、神戸ポートアイランド(2008. 12.9-12)
178. 加藤孝宣、三代俊治、脇田隆宇、HCV JFH-1 株のチンパンジーへの感染実験：in vivo 適応変異の機能的解析。第 44 回日本肝臓学会総会、愛媛、2008 年 6 月。
179. 岩崎優紀、飯島沙幸、吉田友教、木村展之、片貝祐子、揚山直英、明里宏文：霊長類サロゲート C 型肝炎モデル。第 146 回日本獣医学会学術集会（宮崎）平成 20 年 9 月 24 日
180. 岩崎優紀、森健一、榎昇、石井孝司、飯島沙幸、吉田友教、吉崎佐矢香、木村展之、片貝祐子、揚山直英、鈴木哲朗、神奈木真理、宮

- 村達男, 明里宏文: C型肝炎サロゲート霊長類モデル: GBV-B 長期持続感染サルウイルスゲノム解析。第56回日本ウイルス学会学術集会(岡山)平成20年10月26日
181. 海老原敬, 松本美佐子, 脇田隆宇, 瀬谷 司: 抗HCV樹状細胞応答の解析、第73回日本インターフェロン・サイトカイン学会学術集会・第19回日本生体防御学会・第45回補体シンポジウム 合同大会(札幌) 2008.7.10-12
182. 松本美佐子: TLR3-TICAM-1によるdsRNA認識とシグナル伝達、(同上)
183. 東正大, 海老原敬, 松本美佐子, 瀬谷 司: TICAM1依存性クロスプレゼンテーションの解析、(同上)
184. 海老原敬, 松本美佐子, 脇田隆宇, 瀬谷 司: HCV感染アポトーシス細胞を介した抗HCV樹状細胞応答、日本ウイルス学会北海道支部第42回夏季シンポジウム(ニセコ町)、2008.7.26-27
185. 東 正大、海老原敬、久保田信彦、赤澤 隆、松本美佐子、瀬谷 司: 樹状細胞におけるTLR3/TICAM-1経路を介したクロスプレゼンテーションの制御第38回日本免疫学会総会・学術集会(京都)、2008.12.1-3
186. 海老原敬, 松本美佐子, 瀬谷 司: 樹状細胞における新規NK活性化分子の解析、(同上)
187. 押海裕之、坂井圭介, 松本美佐子, 瀬谷 司: IPS-1のCARDドメインと結合するDEAD boxヘリケースのDDX3の単離同定とC型肝炎ウイルスによるI型インターフェロン抑制の新たな機構、第31回分生年会、第81回生化学大会の合同開催(神戸)、2008.12.9-12
- 知的所有権の出願・登録状況
- 特許出願
1. C型肝炎ウイルスワクチン組成物 出願番号: PCT/JP2010/067096 出願日: 2010.9.30 発明者: 森山正樹、赤澤大輔、中村紀子、脇田隆宇
  2. C型肝炎ウイルスのエンベロープタンパク質2に結合する抗体及びそれを用いたC型肝炎ウイルスの遺伝子型の同定方法 出願番号(PCT出願): PCT/JP2009/067051 出願日: 2009.9.30 発明者: 渋谷悠子、中村紀子、脇田隆宇
  3. M161Agからなるサイトカイン誘発剤、登録番号: 2,320,656、発明者: 瀬谷 司、松本美佐子、登録日: 2009年8月4日、出願人: JST
  4. 渋谷悠子、中村紀子: C型肝炎ウイルスのエンベロープ蛋白質2に結合する抗体及びそれを用いたC型肝炎ウイルスの遺伝子型の同定方法、特願2008-254338(2008.12.26) <公開前>
  5. I型インターフェロンの発現調節剤、PCT/JP2008/001648、発明者: 瀬谷司、松本美佐子、押海裕之、出願日: 2008年6月25日、出願人: 北海道大学

## II. 分担研究報告

分担研究報告書

ウイルス粒子大量精製法およびウイルス免疫法の開発

東レ株式会社医薬研究所 中村 紀子

研究要旨 JFH-1 株の発見により初めて HCV のウイルス培養が可能となったことから、HCV の予防的・治療的ワクチンの開発が期待されだしている。本研究では、ワクチン開発の基盤となる HCV 粒子の大量精製法および免疫法を開発すると共に HCV 粒子投与マウスから得られた抗 HCV モノクローナル抗体の中和能について解析する。

A. 研究目的

HCV のワクチン開発が進まなかった最大の理由として、ウイルスが培養細胞系で増殖しなかったこと、宿主域が狭くヒト及びチンパンジー以外の動物に感染・発症しないことが挙げられる。脇田らが劇症肝炎患者から分離した JFH-1 株は、これまでの HCV 株と比較して培養細胞における複製能力が非常に高く、JFH-1 株の合成全長 RNA を培養細胞に導入することにより感染性ウイルス粒子が分泌される。我々は、この JFH-1 株によるウイルス産生系を用いて、感染性ウイルスを調製して、ウイルス感染中和活性のアッセイ系の樹立に成功した。また部分精製したウイルス粒子を小動物に免疫し、感染中和活性が誘導されることを実証した。

そこで本研究では、ワクチンの実用化を目的として、ウイルスの大量精製法の開発、ウイルス粒子の効果的な免疫方法の開発、遺伝子型に依存しないで感染中和活性を誘導できるワクチンの開発、さらに HCV 粒子投与マウスから得られた抗 HCV モノクローナル抗体の中和能について解析する。

B. 研究方法

1. HCV エンベロープタンパク質の作製。

E1、E2 タンパク質をコードする遺伝子から、これらのタンパク質の C 末端に存在する膜貫通ドメインをコードする核酸配列を除去し、翻訳されたタンパク質を細胞外へ分泌するために必要なシグナルペプチドをコードする配列を付加した。さらに、これらのタンパク質の精製を容易にするために、N 末端に FLAG ペプチドを付加させたベクター、あるいは C 末端にヒト IgG Fc ポリペプチドを付加したベクターを作製した。エンベロープタンパク質は、遺伝子型 2a の JFH-1 および J6CF、遺伝子型 1b の TH、J1 および Con1、遺伝子型 1a の H77 を使用した。

2. 感染性 HCV の大量培養

$5 \times 10^5$  個の Huh7 細胞を 10 cm ディッシュに播種し、翌日に感染性 HCV (J6/JFH1:J6CF 株と JFH-1 株のキメラウイルス、遺伝子型 2a) 濃縮液を multiplicity of infection(MOI) が 0.2 となるように 500  $\mu$ L の溶液量で接種した。15 分毎に軽く振とうし、37°C でインキュベーションした。2 時間後、ウイルス液を除去し、PBS で洗浄して 10% FBS 含有 DMEM (DMEM-10) を 8 mL 添加後、

培養した。サブコンフルエントに達した時に、225 cm<sup>2</sup> フラスコ (Corning 社) に継代培養し、さらにセルスタック (5段, Corning 社) に継代培養した。セルスタック培養は 650 mL の培養液で行い、DMEM-10 で播種した翌日に 2% FBS 含有 DMEM (DMEM-2) に培養液交換した。その 3 日後に培養上清を回収し、650 mL の DMEM-2 培養液を添加してさらに培養した。その 2 日後に培養液回収、DMEM-2 添加を行い、さらに 2 日後、培養液を回収する操作を行い、計 650 mL×3 の培養液を回収した。得られた培養液は 0.45 μm フィルター濾過を行い、使用するまで -80°C で保存した。

### 3. HCV 粒子大量精製

HCV 培養上清の限外ろ過膜による精製：

上記に示したように調製した感染性 HCV を含む 21 L の培養上清をホローファイバー UFP-500-C-8A (GE Healthcare 社) で濃縮した。1 L/min の定流速条件下、膜間差圧を 4 で 80 倍濃縮した。その後、等量の PBS を添加してダイアフィルトレーションを 5 回行った。次に、250 mL の PBS を 0.5 L/min の流速で 5 分間循環させることで限外濾過膜を洗浄して回収し、濃縮液と混合して最終濃縮液 (500mL) とした (最終 42 倍濃縮)。

ゲルろ過クロマトグラフィーによる精製：

カラム容積 250mL の Sepharose 6 Fast Flow (BD 社) に 25mL の限外ろ過膜で精製・濃縮したサンプルを添加し、3mL/min、10mL のフラクションで展開した。

イオン交換クロマトグラフィー：

イオン交換担体として、1mL の HiTrap Q HP (BD 社) を用い、20mM piperazine (pH5.0) で平衡化し、

5mL のサンプルを添加し、20mL piperazine、2M NaCl (pH5.0) にて塩濃度勾配で溶出させた。

シヨ糖密度勾配遠心：

10-60% (w/v) シヨ糖含有 20 mM Tris-HCl (pH7.4) -150 mM NaCl-0.05 mM EDTA (TNE バッファー) を調製し、Ultra-Clear™ Centrifuge Tubes (BECKMAN 社) に 60%、50%、40%、30%、20% および 10% シヨ糖/TNE の順に 2 mL ずつ重層した後、上記のように調製した溶出プール画分を 23 mL をさらに重層した。重量を測定しバランスを合わせた後、Optima L-70K (BECKMAN 社) で SW28 ローターにて 28,000 rpm、4°C、4 時間遠心分離した。遠心後のチューブは 25G 注射針 (テルモ社) を用いて下部を穿刺し、1.5 mL チューブに約 1 mL ずつ 14 分画を抽出した。予め重量を測定しておいた 1.5 mL チューブに 100 μL の各分画を分注し、分注後のチューブ重量を測定して比重を算出した。

各分画液から QIAamp™ Viral RNA Mini Kit (Qiagen 社) を用いて RNA を抽出し、定量的 RT-PCR により HCV-RNA を定量した。また、HCV コア定量キット (オーソ社) により HCV-core タンパク質を定量した。感染力価は、DMEM-10 で希釈した各分画液について測定した。

各々の調製された HCV 粒子は HCV-core タンパク質、HCV-RNA、感染力価および総タンパク質濃度を測定し、使用まで -80°C で保存した。

### 4. エンベロープタンパク質および精製 HCV 粒子のマウスへの免疫

HCV 抗原：

エンベロープタンパク質は J6CF 株由来の E2 タンパク質とヒト IgG の Fc 部分とのキメラタン



パク質(J6E2-Fc)を用いた。

ウイルス抗原として、12 L の J6/JFH1 培養上清(比活性(core/protein)=0.039 pmol/mg)から限外ろ過膜およびショ糖密度勾配遠心により精製し(比活性=94.3pmol/mg)、2400 倍に精製された HCV を紫外線照射にて不活化して使用した。1 回の投与量は、1 匹あたり 2 pmol の HCV コアタンパク質に相当する HCV とした。

アジュバント:

Alum(Imject Alum;Thermo SCIENTIFIC 社)、CpG(Mod87;東レ)、polyI:C(Yamasa Shoyu 社)および MPL+TDM(Sigma Adjuvant System;Sigma 社)をそれぞれ、1 匹当たり、200  $\mu$ g、25  $\mu$ g、100  $\mu$ g および 100  $\mu$ L 用いた。単独および組合わせて使用した。

投与スケジュール:

4 週齢雌性 BALB/c マウスは日本クレアより購入し、国立感染症研究所動物管理区 SPF 感染実験区に搬入した。投与する精製 HCV 粒子は 5 分間の UV 照射によって不活化させた。マウスを 1 週間馴化の後、下記投与群に 0、2、4 および 6 週に種々のアジュバントと抗原を混合し腹腔内投与した。投与後 1、3、5 および 7 週に眼窩より採血した。採血後すぐに血清分離剤入りの 1.5 mL チューブに添加し、5 回転倒混和して 30 分以上室温で静置した。血清分離剤は BD パキュティナ SST II 採血管 (BD 社) のものを 1.5 mL チューブに約 50  $\mu$ L ずつ分注して使用した。その後、1,200 $\times$ g、10 分間室温で遠心分離し、上清に分離された血清を新しい 1.5 mL チューブに移して使用まで -80 $^{\circ}$ C で保存した。

投与群は①生理食塩水(大塚製薬、陰性コントロール) (n=5)、② J6/JFH1+Alum (n=5)、③

J6/JFH1+CpG (n=5)、④ J6/JFH1+polyI:C (n=5)、⑤ J6/JFH1+Alum+CpG (n=5)、⑥ J6/JFH1+Alum+polyI:C (n=5)、⑦ J6/JFH1+CpG+polyI:C (n=5) および⑧ J6/JFH1+MPL+TDM (n=5) とした。

#### 5. HCV シュード粒子 (HCVpp) の作製

HCV のエンベロープタンパク質を有する HCVpp は Bartosch らの方法に従って作製した。2.5 $\times$ 10<sup>6</sup> 個の 293T 細胞を 10 cm コラーゲンコートディッシュ (IWAKI 社) に播種し、一昼夜培養後、FuGENE 6 (Roche 社) を用いて 3  $\mu$ g の MMLV Gag-Pol 発現ベクター (Gag-Pol)、3  $\mu$ g の LTR カセット挿入 luciferase 発現ベクター (Luc126) および 1  $\mu$ g の HCV E1E2 発現ベクター (pcDNAdeltaC-E1-E2) をトランスフェクションし、6 時間後に培養液を交換した。48 時間培養後の培養上清を回収し、0.45  $\mu$ m フィルターで濾過して使用まで -80 $^{\circ}$ C で保存した。陰性対照として、HCV E1E2 発現ベクターをトランスフェクションしない培養上清 (no env.) を作製し同様に保存した。

#### 6. マウス血清の感染阻害活性の測定

感染阻害実験は HCVpp または HCVcc を用いて行った。HCVpp を使用する場合は、2 $\times$ 10<sup>4</sup> 個の Huh7.5.1 細胞を 48-well プレート (IWAKI 社) に播種し、一昼夜培養後、接種材料を感染させた。前項で得られたマウス血清は 56 $^{\circ}$ C、30 分間インキュベーションすることで非働化した。HCVpp または感染性 HCV 粒子と終濃度 1% (v/v) マウス血清を混合し、室温で 30 分間インキュベーションした後、細胞に接種して 37 $^{\circ}$ C で 3 時間培養した。その後、感染材料を除き、PBS で洗浄、0.5 mL

の培地を添加して 72 時間培養した。細胞のライセートは、PBS でウェルを洗浄後、40  $\mu$ L/well の 1×Cell Culture Lysis Reagent (Promega 社) を添加して調製した。

HCVpp の感染は上記ライセートの 20  $\mu$ L を Luciferase Assay System (Promega 社) 50  $\mu$ L と反応させ、攪拌後直ちに Lumat LB9507 (Berthold) を用いて 10 秒間の発光値を測定することで評価した。

HCVcc を使用する場合は、前日に poly-D-lysine コート 96-well plate (BD BioCoat™ 96 ウェルマイクロプレート、BD 社、#356461) に Huh-7.5.1 細胞を  $1 \times 10^4$  cells/100  $\mu$ L/well で播種した。マウス血清を培地で 50 倍に希釈して、HCVcc と等量で混合し、室温で 30 分間静置した (マウス血清の最終希釈倍率 100 倍)。また、血清の陽性対照として、HCV 受容体の一つである抗 CD81 抗体を用いた。インキュベーション後、培地を除去した細胞に、上記血清希釈サンプルと HCVcc の混合液を 50  $\mu$ L/well で添加して 37°C、3 時間、インキュベーションして感染させた (HCVcc は moi=1) (または、マウス血清溶液 25  $\mu$ L/well、HCVcc 溶液 25  $\mu$ L/well の順に細胞に添加して、感染させた)。インキュベーション後に上清を除去し、PBS 100  $\mu$ L/well で一度洗浄した後に、培地 200  $\mu$ L/well に置換して 37°C で 72 時間培養した。培養後、培地を除去し、PBS 100  $\mu$ L/well で一度洗浄した後に、メタノールに浸して -20°C で 15 分静置した。その後、プレートを乾燥させて、検出する時まで -80°C で保存した。後日、各 well の core 量をマウス抗 HCV Core 抗体 2H9 で測定することにより、その値を感染 HCV 量として、そこから感染阻害活性を算出

した。

## 7. モノクローナル抗体の解析

JFH-1 由来 E2 タンパク質、J6CF 由来 E2 タンパク質、JFH-1 粒子および J6/JFH-1 粒子を免疫したマウスより作製した各種抗 E2 タンパク質モノクローナル抗体のエピトープを解析するために、エンベロープタンパク質の 10 個の連続するアミノ酸を N 末端から 3 アミノ酸ずつずらして合成したのペプチドを EIA プレートに固相化し、次いで各種モノクローナル抗体を加え、モノクローナル抗体が結合するペプチドをスクリーニングした。

### (倫理面への配慮)

本研究計画の実験計画は所属施設に提出されその承認を得ている。取り扱うすべての DNA および病原性微生物に関しては適切な封じ込めレベルの実験施設で取り扱われる。取り扱うすべての DNA に関して組み換え DNA 実験計画を提出し承認を得ている。また、動物実験は国立感染症研究所動物実験委員会の承認を得て行っている。ヒトの遺伝子解析を行う予定はない。

## C. 研究結果

### 1. エンベロープタンパク質の作製

エンベロープタンパク質の N 末端側に Flag タンパク質と C 末端に Fc タンパク質を付加したキメラタンパク質を作製した。COS-1 細胞での一過的な発現では、Fc タンパク質とのキメラからなるエンベロープタンパク質は発現量が高く、1 ~ 2mg/L であった。

本エンベロープタンパク質発現系は、抗 HCV 抗体の評価用の抗原として有用であり、本抗原を

用いて、HCV抗体検出用EIA系を構築した。

## 2. HCV粒子大量精製

感染性HCVを含む培養上清21L中のコアタンパク質量、HCV RNA量および全タンパク質量を測定した。その結果、それぞれ、615.4pmol、 $8.7 \times 10^7$ コピー/mL、15,903mgであった。このサンプルを限外濾過することにより、液量が563mLとなり、コアタンパク質量、HCV RNA量および全タンパク質量は、それぞれ609.3pmol、 $1.87 \times 10^9$ コピー/mL、166.8mgとなった。コアタンパク質とHCV-RNA量の回収率は、それぞれ99%および56.4%であった。また、タンパク質量は1%となり、コアタンパク質量に基づき、比活性(コアタンパク質量/全タンパク質量: pmol/mg)から、限外濾過で100倍精製されたことになる。

部分精製HCV粒子、25mL(コアタンパク質量; 66pmol、全タンパク質量; 7.7mg)を250mLのSephacrose 6 Fast Flowでゲル濾過を行った結果、コアタンパク質のピークはvoid volume分画に溶出され、その容量は30mLであった。そのときのコアタンパク質量および全タンパク質量はそれぞれ46.7pmol、0.9mgであり、コアタンパク質の回収率は71%、コアタンパク質量に基づけば、比活性から、ゲル濾過クロマトグラフィーで6倍精製されたことになる。

次に、部分精製HCV 5mL(コアタンパク質量; 1.335pmol、全タンパク質量; 0.029mg)を用いて、陰イオン交換クロマトグラフィーを行った。その結果、コアタンパク質が存在する画分の全容量は9mLであり、そのときのコアタンパク質量および全タンパク質量はそれぞれ0.16pmol、0.0082mgであり、コアタンパク質の回収率は12%

となった。コアタンパク質量に基づき比活性を計算するとイオン交換クロマトグラフィーで回収率が低いため精製度が約1/2になった。

## 3. 組換えタンパク質と精製HCV粒子のワクチン効果の比較

非働化したマウス血清をJ6CFのE1E2を有するHCVppと混合した後、Huh7細胞に感染させその感染阻害活性を調べた。HCVppと混合する血清は1/100量とした。その結果、本条件においてHCV粒子を免疫したマウス血清では約50%の感染阻害活性を示した。一方、組換えタンパク質投与群においては、0.02および0.2  $\mu$ g/headの投与群では有意な感染阻害活性は認められず、2  $\mu$ g/headの投与群においてもその活性はHCV粒子投与群と比較して同等以下であった。このことから、精製HCV粒子は組換えタンパク質を免疫原として用いた場合よりも抗体誘導、特に、中和抗体誘導能が高いことが示唆された。

## 4. アジュバントによるワクチン効果の比較

不活化J6/JFH1-HCVを抗原として、種々のアジュバントおよびそれらを組合せたものを用いて、2週間おきに4回マウスの腹腔に投与し、免疫後1週間後毎に採血し、血清を調製した。血清を1,000倍希釈し、E1およびE2タンパク質に対する抗体価をEIAにて測定した。その結果、MPL+TDMを使用した時、E1およびE2タンパク質に対する抗体価が最も強く、それに対してAlumおよびCpG単独はその1/3-1/6であった。

また、各アジュバント使用時のE2タンパク質に対する抗体のアイソタイプについて調べた。その結果、Alum単独およびCpG単独はIgG1の誘導

は高いが IgG2a、IgG2b、IgG3 は低かった。その他のアジュバントおよびその組み合わせはいずれのアイソタイプも高く誘導した。

次に遺伝子型 2a の E1 および E2 タンパク質を有する J6-HCVpp に対する感染阻害活性を測定した。マウス血清は 100 倍希釈して使用した。その結果、MPL+TDM、Alum 単独、CpG 単独、Alum+CpG が高い中和活性を示した。特に、Alum+CpG は HCVpp の感染を 60%阻害した。さらに、同一血清サンプルを使用して、免疫に使用した遺伝子型 2a 以外の遺伝子型の HCVpp の感染阻害について検討した。遺伝子型 1a の H77-HCVpp および遺伝子型 1b の TH-JFH1pp を使用して感染阻害活性を測定した結果において、Alum+CpG および MPL+TDM は、HCV の感染阻害活性を示す抗体を優位に誘導することが分かった。この結果は、遺伝子型 2a の HCV で免疫して誘導される抗体中には、遺伝子型 2a の HCV の感染を阻害する抗体だけではなく、遺伝子型 1a および 1b の HCV の感染を阻害する抗体も存在することを示している。

さらに、HCVcc に対する感染阻害活性を測定した。HCVcc として、遺伝子型 2a の J6/JFH1 および遺伝子型 1b の TH/JFH-1 を用い、マウス血清は 100 倍希釈して使用した。その結果、Alum+CpG および MPL+TDM は、いずれの遺伝子型の HCVcc に対しても感染阻害活性を示す抗体を優位に誘導することが分かった。

以上から、評価したアジュバントの中では、Alum+CpG が最も高い免疫応答を誘導した。

## 5. モノクローナル抗体のエピトープ解析

J6/JFH-1 粒子を投与したマウスからもモノクローナル抗体を作製した。J6E1/Fc+J6E2/Fc タン

パク質を固相化したプレートで EIA を行い、エンベロープタンパク質を認識する抗体を産生する 20 クローンのハイブリドーマを得た。さらに J6-HCVpp を用いて、感染阻害活性を測定した結果、4 種類の抗体が感染を阻害することが判明した。濃度依存的な感染阻害を示す 2 クローンのハイブリドーマが産生する抗体について、10 アミノ酸残基からなるペプチドを用いて、エピトープマッピングを行った結果、1 種類の抗体は E2 タンパク質のペプチドを認識するのに対し、もう 1 種類の抗体はペプチドを認識しなかった。この結果は、該抗体が HCV エンベロープタンパク質の立体構造を認識する抗体である可能性を示している。

## D. 考察

我々は、これまでに遺伝子型 2a キメラ HCV である J6/JFH1 を用いた精製方法の検討を行い、大量のサンプルからポアサイズ 500 kDa のホローファイバーを使用した濃縮・粗精製の後、シヨ糖密度勾配遠心で分画することでウイルス成分と夾雑タンパク質を比較的効率よく分離することが可能であること、さらに、この工程で得られた精製 HCV 粒子がマウスにおいてワクチン能を有することを確認してきた。しかし、シヨ糖密度勾配遠心で分画する方法は工業的精製法としては不向きである。そこで、クロマトグラフィーを使用して精製工程を検討した。その結果、Sepharose 6 Fast Flow を使用したゲル濾過は回収率もほぼ 100% と高いのに対し、イオン交換クロマトグラフィーは回収率が極めて低かった。展開緩衝液の pH についても検討したが著しい改善は認められなかった。イオン交換クロマトグラフィーにおけ