

平成23年度厚生労働科学研究費補助金
(新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業)

情報弱者等への配慮を含めた感染症に対する 適切な情報提供・リスクコミュニケーションに 関する研究

研究代表者 丸井英二
(順天堂大学医学部公衆衛生学教室)

研究概要

1. 感染症等に関するリスク認知調査
2. 情報提供の現状
 - 東日本震災における感染症の発生と新聞報道の現状
3. 情報媒体の開発と評価
 - 小学校教育における利用のためのプログラム開発と実施及び評価
4. 幼児向け媒体開発
5. 動物由来感染症HPの改訂
6. 情報提供媒体としてのホームページの在り方検討
 - HP利用者対象プレ調査
 - 模擬HPの作成

感染症等のリスク認知構造

1. 感染症等に関するリスク認知調査
2. 情報提供の現状
3. 情報媒体の開発と評価
4. 幼児向け媒体開発
5. 動物由来感染症HPの改訂
6. 情報提供媒体としてのホームページの在り方検討

- 調査時期: 平成23年9月(震災より半年後)
- 対象者: gooリサーチモニター20歳台から60歳台までの1054名
- 調査地域: 全国

	因子		
	1	2	3
炭疽菌	1.079	-0.066	-0.159
エボラ出血熱	0.979	0.037	-0.182
SARS	0.906	-0.093	0.056
狂犬病	0.836	0.009	0.015
BSE狂牛病	0.778	0.090	0.004
HIV/AIDS	0.766	0.010	0.096
鳥インフルエンザ	0.733	-0.044	0.117
肝炎	0.653	-0.009	0.234
結核	0.517	0.053	0.335
遺伝子組み換え食品	-0.050	0.915	-0.088
食品添加物	-0.199	0.914	0.057
電磁波	-0.074	0.840	0.033
残留農薬	0.093	0.762	0.030
魚介類に含まれる水銀	0.258	0.651	-0.049
受動喫煙	-0.017	0.594	0.124
大気中の発がん性物質	0.335	0.557	0.019
放射能	0.372	0.546	-0.032
ノロウイルス	-0.075	0.021	0.948
新型インフルエンザ	-0.011	0.026	0.842
Q157	0.264	0.050	0.603

因子抽出法: 主成分法
回転法: Kaiser の正規化を伴うプロマックス法
a. 6 回の反復で回転が収束しました。

あなた自身に どの程度起こりそうだと思いますか

	感染症で死に至る		バイオテロの被害者になる		放射線被ばくで死に至る	
	実数	%	実数	%	実数	%
1 起こらない	77	7.3	106	10.1	94	8.9
2 どちらかといえば起こらない	280	26.6	327	31.0	278	26.4
3 どちらともいえない	471	44.7	441	41.8	440	41.7
4 どちらかといえば起こりそう	140	13.3	83	7.9	152	14.4
5 起こりそう	35	3.3	22	2.1	56	5.3
6 わからない	51	4.8	75	7.1	34	3.2
全体	1054	100.0	1054	100.0	1054	100.0

2. 東日本大震災における感染症の発症と新聞報道の現状

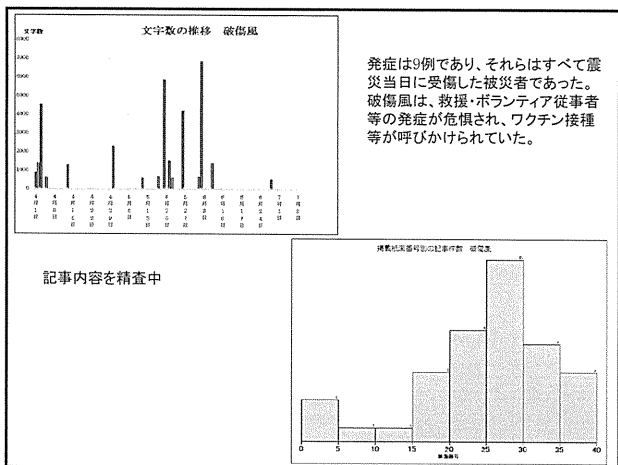
1. 検証
 - 恐怖感や発生しているとの誤認を与えるような報道になっていなかったか
 - 災害後の感染症の集団発生予防の警告がされていたか
2. 方法
 - 感染症発生状況は、国立感染症研究所感染症情報センターホームページ「感染症発生動向調査(全数報告)」のうち、震災に関連した届出症例を利用
 - メディア報道は、日経テレコンによって、読売、朝日、毎日、産経新聞の朝刊・夕刊を検索
 - 検索キーワードは、「感染症」「肺炎」「破傷風」「食中毒」
 - 東日本大震災に関連するもののみを抽出した。
 - 検索は震災翌日の2011年3月11日から2011年8月31日までの期間

文字数の推移 感染症

破傷風発生当初、感染症の報道は見られなかった
- それどころではない?
注意喚起を促す報道が多かった
- 社会面ではない(図2)

発生事例の報道

- ・ 郡山の避難所でノロウイルス検出。60人が発症 2011 4/11 朝日新聞
- ・ 一関でノロ集団感染 2011 5/15 読売新聞
- ・ 金津若松で19人食中毒 2011 5/17 毎日新聞
- ・ 福島の避難所で69人食中毒 2011 6/15 産経新聞



狂犬病予防を目的としたカルテットゲームの教育現場における教育プログラムの開発と評価

研究協力: 三重県尾鷲保健所 三重県動物愛護管理センター 三重県内小学校

1 感染症等に際するリスク認知調査
2 情報提供の現状
3 情報提供の開発と評価
4 幼児向け媒体開発
5 動物由来感染症HPの改訂
6 情報提供媒体としてのホームページの在り方検討

2012年度(平成24年) 第208号(第4期)

カードゲーム 授業に効果
「学習する子」尾鷲などの児童が学ぶ

楽しく動物愛護学習
買田小で県立尾鷲保健所
尾鷲小で県立尾鷲保健所
尾鷲小で県立尾鷲保健所

読売新聞(三重県全域)、紀勢新聞、南海日日新聞に掲載
NHK ぽっぴんぐ三重、ニュース20:45 (三重県全域)
NHKラジオで放送

カードゲーム「わんわんカルテット」について、あなたの感想や考えを聞きます。(1)から(3)までは、あてはまる回答に1つ○をつけてください。(4)は、自由に書いてください。

1 ゲームのルールは、わかりやすかったですか。

とてもわかりやすかった	まあまあわかりやすかった	少しわかりにくかった	とてもわかりにくかった
95.6%	4.2%		

2 ゲームで遊んで、楽しかったですか。

とても楽しかった	まあまあ楽しかった	あまり楽しなかった	ぜんぜん楽しなかった
95.7%	4.3%		

3 ゲームで遊んで、何か新しいことを学びましたか。

とても学ぶことがあった	少し学ぶことがあった	あまり学ぶことがなかった	ぜんぜん学ぶことがなかった
75.0%	25.0%		

ゲームで遊んで、思ったことや感じたことがあれば教えてください。

- ゲームで遊んで、新しいことを学ぶことができました。また教えてください、ありがとうございました。
- 知らないことも分かったから良かった。
- 毎年1回注射をしなければいけないのが、初めてわかりました。
- 犬のことは、わからないことがあって、今日わかった
- カルテットだけでアンケートの答えがわかった

小学校3年生以上を対象 カード内の情報(知識の習得度)

次の(1)から(10)までの文章で、あなたが正しいと思うものには○、間違っていると思うものには×を、右の口につけてください。

	第1回目	第2回目
1犬は15年くらい、長生きします。	75%	100%
2犬を飼ったら、役所(やくしょ)にとどけなければなりません。	0%	100%
3犬は、毎年1回、ちゅうしゃをします。	100%	100%
4犬には、よんだらくるようにしつけをします。	87.5%	100%
5犬が、病気で熱があるかどうか、鼻でわかります。	75%	100%
6犬のおなかのなかに、虫がいることがあります。	75%	100%
7犬をさわったあとはせっけんで手をあらいます。	100%	100%
8犬とキスをすると、びょうきがうつことがあります。	37.5%	100%
9ひとやどうぶつがきょうけん病になると100%死にます。	50%	100%
10もうどうけんは、め(目)のふじゅうなひとをゆうどうします	100%	100%

2月下旬まで調査継続中

背景

1 感染症等に際するリスク認知調査
2 情報提供の現状
3 情報提供の開発と評価
4 幼児向け媒体開発
5 動物由来感染症HPの改訂
6 情報提供媒体としてのホームページの在り方検討

ゲームを利用した普及啓発と評価(研究1年目)

2012年度 日本感染症学会(長崎)にて発表(ポスター採択)予定

幼児向け媒体開発
(参加型:ギミック利用の紙芝居)

紙芝居「食事場」
ページ04

- 利用場面: イベント会場(不特定多数)
- 対象: 小学校入学前の幼児
- 目的: 「手洗い」の重要性の認識を獲得すること及び実行すること。
- 内容: ①外出先からの帰宅時 ②食事前 ③トイレの後 の3パターン
- 次年度ショッピングセンターでの実施にともなう評価を予定


「手洗い」の重要性を認識すること及び実行すること。

「手洗い」の重要性を認識すること及び実行すること。

「手洗い」の重要性を認識すること及び実行すること。

5. 動物由来感染症HPの改訂

1. 感染症等に関するリスク認知調査
2. 情報提供の現状
3. 情報媒体の現状と評価
4. 知覚向け媒体開発
5. 動物由来感染症重点の改訂
6. 情報提供媒体としてのホームページの在り方検討



リスクコミュニケーションの観点にたち、内容の精査にもとづき、

- ・わかりやすい
- ・誤認を防ぐ

デザインの構築を実施

6. 情報提供媒体としてのホームページの在り方検討

1. 感染症等に関するリスク認知調査
2. 情報提供の現状
3. 情報媒体の現状と評価
4. 知覚向け媒体開発
5. 動物由来感染症重点の改訂
6. 情報提供媒体としてのホームページの在り方検討

1) 「情報弱者」のニーズや感染症対応等現状把握：携帯電話を利用したプレ調査
 ・学童・生徒——中学、高校(アウトリーチの方法、表現・表記の検討)
 ・高齢者——60歳ぐらから上の年齢でネットを使える方(デザイン・表現を工夫)
 ・日本語以外の母国語の日本滞在者——言語の選定と、詳細説明は国際機関や自国のHPからの情報収集とする

2) 既存WEBの問題点を確認

問. 感染症(伝染病)について、情報を探すとしたら何を使いますか? 10~19歳の男女対象
 「問」では、「インターネット(携帯サイトも含む)」(95.5%)が最も多く、以下「テレビ」(69.7%)、「新聞」(41.3%)の順となっている。

回答	件数	%
1. 記事	86	47.2
2. テレビ	72	39.2
3. 新聞	43	22.8
4. インターネット(携帯サイトも含む)	25	13.2
5. 雑誌	12	6.3
6. 音声	11	5.8
7. 動画	10	5.3
8. その他	10	5.3

問. 感染症(伝染病)について、情報を探すとしたら何を使いますか? 65歳以上の男女対象
 「問」項目では、「インターネット(携帯サイトも含む)」(55.3%)が最も多く、以下「新聞」(23.6%)、「テレビ」(17.8%)の順となっている。

回答	件数	%
1. 記事	39	21.1
2. テレビ	30	16.7
3. 新聞	24	13.3
4. インターネット(携帯サイトも含む)	18	10.0
5. 雑誌	12	6.7
6. 音声	11	6.1
7. 動画	10	5.6
8. その他	10	5.6


3) Webの目的を明確化(画面の作成)

1. 「国内・外でどんな病気が流行っているのか」を確認できる
2. 「自分が今、り患しているかどうか」疑う: 病名と症状の一覧
3. 流行中の感染症予防法がわかる
4. 医療機関へ持参するチェックリスト(症状、渡航歴等): ダウンロード

実験用Web画面(案) 情報提供疾患は以下の4つに限定 (研究班HPへ次年度アップ予定)

感染症ニュース

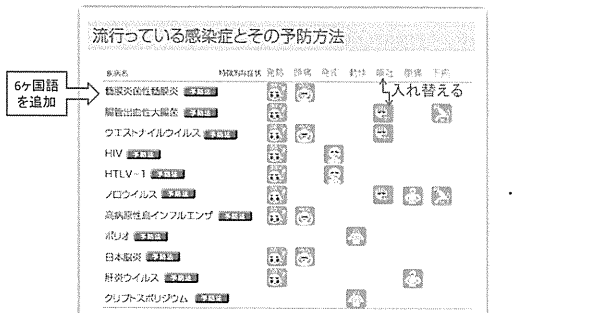
感染症発生状況



発症感染症	発症数	発症数(全世界)
■ 新型コロナウイルス	4,527	419,064,297
■ 新型コロナウイルス	3,482	388,481,872
■ 新型コロナウイルス	2,138	247,383,561
■ HIV	1,193	111,139,001

実験用Web画面(案) 情報提供疾患は以下の4つに限定 (研究班HPへ次年度アップ予定)

症状を、図で表現する
 画像から感覚的には入れるように、必要な情報へ導く
 言語は中国語、韓国語、英語、スペイン語、アラビア語、ロシア語で表記(疾患名)



6ヶ国語を追加

入れ替える

4) 次年度(最終年度)

- ・各機関での提供方法の在り方へのモデルを示すモック画面
- ・感染症のポータルサイトを作成し、心理実験を実施する

平成 23 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：培養細胞感染系の確立されていない病原体の実験技術の開発と予防診断法に関する研究

課題番号：H22-新興-一般-017

予定期間：H22 年度から H24 年度まで

研究代表者：鈴木 哲朗

所属研究機関：浜松医科大学

所属部局：医学部感染症学講座

職名：教授

年次別研究費(交付決定額)：1 年目 36,000,000 円 2 年目 30,600,000 円

I. 研究の意義

- (1) ノロウイルス (HuNoV) は感染増殖機構、周期的流行機序が不明であり、治療薬がない。
- (2) B 群ロタウイルス (RoV)、ヒトボカウイルス (HBoV) は血清診断系が確立していない。
- (3) ポリオーマウイルスは簡便な診断系がなく新規ウイルス (MCV, KIV, WUV) 関連疾患が十分に明らかでない。パピローマウイルス (HPV) 感染症は特異的治療法が確立していない。
- (4) E 型肝炎ウイルス (HEV) は増殖機構が不明で治療薬がない。
- (5) 慢性化率の高い B 型肝炎ウイルス (HBV) 遺伝子型 A の感染が広がっている。

II. 研究の目的、期待される成果

- (1) HuNoV の培養系を作製、流行機序を明らかにし感染予防法策定、治療薬開発へ道を拓く。
- (2) B 群 RoV、HBoV 各遺伝子型の診断技術を開発し、幼児小児の感染症診断系整備に資する。
- (3) 新興ポリオーマウイルス MCV、KIV、WUV の診断系を確立し関連疾患を明らかにする。
- (4) HPV 関連子宮頸癌の治療法開発に繋がる分子基盤を確立する。
- (5) 効率の良い HEV 培養系を確立し、複製増殖機構を解明し治療法開発に繋げる。
- (6) 遺伝子型特異的な HBV 抗原検出法、全遺伝子型に有効な B 型肝炎ワクチン開発のための基盤技術を確立する。

III. 2 年間の研究成果

・ 研究代表者

- (1) T=7、直径 48 nm の MCV 粒子構造を明らかにし、レポーター粒子モデルで MCV の糖脂質糖鎖依存的感染性を示した。抗 MCV 抗体保有状況を調査し、肺癌患者での高保有率傾向などを示した。
- (2) 糖鎖 ELISA によるポリオーマウイルス抗原診断系の可能性を示した。

・ 研究分担者

- (1) 次世代シーケンサーを用いて、感染者における HuNoV 準種の実態、動態を解析 (本村)
- (2) HuNoV の周期的流行機序解析に用いる、各流行年由来 HuNoV 中空粒子精製に成功 (本村)
- (3) HuNoV のサロゲートモデルとして有用なマウス NoV の細胞馴化機序を解明 (中西)
- (4) リバースジェネティクスシステムによる HuNoV 産生系及びマウス NoV 感染増殖細胞系についてノロウイルス増殖諸過程を経時的に比較解析し、近似性、差異を明らかにした (片山)
- (5) 食中毒事例等由来の新鮮糞便検体を用いて HuNoV 感染感受性を 14 種類の細胞株で解析 (田中)
- (6) 多株遺伝子解析、分子系統樹解析から、B 型 RoV の遺伝子型分類基準を確立 (恒光)
- (7) ノトバイオートブタ感染系が B 型 RoV の病態モデルとして有用であることを明らかにし、株間での病原性の違いを示した (恒光)
- (8) 新興ポリオーマウイルス KIV, WUV のレポーター粒子モデルを作出し感染支持細胞を取得した。同ウイルスに対する中和抗体の解析が可能となった (中西)
- (9) KIV, WUV 及び HBoV 各遺伝子型 (1~4) のウイルス様粒子をバキュロウイルスで産生、精製し、

抗体検出系を確立。我が国健常人における抗体保有率を明らかにした (李)

- (10) 子宮頸癌特異的治療薬の開発を目指し、HPV E6/E6AP による癌化を阻害する分子を探索し、p53 のユビキチン化を阻害する E6AP 結合性ペプチドを見出した (勝二)
- (11) HBV S 粒子の分泌効率決定基が PreS2 翻訳開始域に点在することを証明 (勝二)
- (12) 新規 HEV 感染性クローンを取得。ヒト肝がん細胞株のリクローン化から、HEV 吸着侵入感受性の異なる細胞クローン種を単離 (石井)

IV. 平成 24 年度の課題

- (1) ウイルス様粒子を用いて樹立した抗体診断系による血清疫学的解析 (B 型 RoV, HBoV, KIV, WUV)
- (2) モデルシステム等による生活環、病態発現機構解析 (HuNoV, B 群 RoV, KIV, WUV, MCV, HEV)
- (3) 遺伝子・抗原抗体診断、治療法開発へ向けた技術向上 (HBV, HPV, B 群 RoV)

V. 行政施策への貢献の可能性

- (1) 新興ウイルスに対する血清診断系の確立、感染流行機序解析による感染予防法の策定に寄与
- (2) 培養系の確立、感染増殖機構解析、さらに、新規コンセプトによる創薬基盤研究から、新たな抗ウイルス薬開発に貢献

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

- Saeed M, Suzuki R, Watanabe N, Masaki T, Tomonaga M, Muhammad A, Kato T, Matsuura Y, Watanabe H, Wakita T, Suzuki T. Role of the ERAD pathway in degradation of hepatitis C virus envelope proteins and production of the viral particles. *J Biol Chem* 286: 37264-37273 (2011).
- Yamamoto M, Aizaki H, Fukasawa M, Teraoka T, Miyamura T, Wakita T, Suzuki T. Structural requirements of virion-associated cholesterol for infectivity, buoyant density and apolipoprotein association of hepatitis C virus. *J Gen Virol* 92: 2082-2087 (2011).
- Saeed M, Shiina M, Date T, Akazawa D, Watanabe N, Murayama A, Suzuki T, Watanabe H, Hiraga N, Imamura M, Chayama K, Choi Y, Krawczynski K, Liang TJ, Wakita T, Kato T. In Vivo adaptation of hepatitis C virus for efficient virus production and evasion of apoptosis. *Hepatology* 54: 425-433 (2011).
- Inoue Y, Aizaki H, Hara H, Matsuda M, Ando T, Shimoji T, Masaki T, Shoji I, Homma S, Matsuura Y, Miyamura T, Wakita T, Suzuki T. Chaperonin TRiC/CCT participates in replication of hepatitis C virus genome via interaction with the viral NS5B protein. *Virology* 410: 38-47 (2011).
- Masaki T, Suzuki R, Saeed M, Mori K, Matsuda M, Aizaki H, Ishii K, Maki N, Miyamura T, Matsuura Y, Wakita T, Suzuki T. Production of infectious hepatitis C virus by using RNA polymerase. I-mediated transcription. *J Virol* 84; 5824-5835 (2010).
- Moriishi K, Shoji I, Mori Y, Suzuki R, Suzuki T, Kataoka C, Matsuura Y. Involvement of PA28gamma in the propagation of hepatitis C virus. *Hepatology*. 252; 411-420 (2010).
- Murayama A, Weng L, Date T, Akazawa D, Tian X, Suzuki T, Kato T, Tanaka Y, Mizokami M, Wakita T, Toyoda T. RNA polymerase activity and specific RNA structure are required for efficient HCV replication in cultured cells. *PLoS Pathog.* 6; e1000885 (2010).
- Hmwe SS, Aizaki H, Date T, Murakami K, Ishii K, Miyamura T, Koike K, Wakita T, Suzuki T. Identification of hepatitis C virus genotype 2a replicon variants with reduced susceptibility to ribavirin. *Antiviral Res* 85: 520-524 (2010)

研究分担者

- Suzuki T, Kuga K, Miyazaki A, Tsunemitsu H. Genetic divergence and classification of non-structural protein 1 among porcine rotaviruses of species B. *J Gen Virol*. 92: 2922-2929. 2011. (恒光)
- Oka T, Yokoyama M, Katayama K, Tsunemitsu H, Yamamoto M, Miyashita K, Ogawa S, Motomura K, Mori H, Nakamura H, Wakita T, Takeda N, Sato H. Structural and biological constraints on diversity of regions immediately upstream of cleavage sites in calicivirus precursor proteins. *Virology*. 394; 119-129, 2009 (片山、恒光、本村)
- Motomura K, Yokoyama M, Ode H, Nakamura H, Mori H, Kanda T, Oka T, Katayama K, Noda M, Tanaka T, Takeda N, Sato H, and the Norovirus Surveillance Group of Japan. Divergent Evolution of Norovirus GII/4 By Genome recombination over 2006-2009 in Japan. *Journal of Virology* 84: 8085-97; 2010. (本村、片山、田中)
- vo N, SahBandar, Takahashi K, Motomura K, Djorban Z, Kitamura K, Sato H, Pohan H, Sato S. The Indonesian Variants of CRF33_01B: Near-Full Length Sequence Analysis. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 27: 97-102; 2011 (本村)

- Yamashita Y, Ootsuka Y, Kondo M, Oseto M, Doi M, Miyamoto T, Ueda T, Kondo H, Tanaka T, Wakita T, Katayama K, Takeda N, Oka T. Molecular Characterization of Sapovirus Detected in a Gastroenteritis Outbreak at a Wedding Hall. *J. Med. Virol.* 2010, 82:720-726 (田中、片山)
- 田中智之. 消化器症候群 ノロウイルス ウイルス感染症の検査・診断スタンダード. 129-133, 2011 (田中)
- 田中智之. 院内感染予防におけるノロウイルス迅速診断法の活用. 感染対策 ICT ジャーナル. 427-433, 2010. (田中)
- 田中智之. ノロウイルス食中毒. 食品微生物学辞典. 中央法規出版株式会社. P188-189, 2010 (田中)
- Murakami K, Suzuki S, Aoki N, Okajima T, Nadano D, Uchida K, Yamashita K, Oka T, Katayama K, Takeda N, Matsuda T. Binding of Norovirus virus-like particles (VLPs) to human intestinal Caco-2 cells and the suppressive effect of pasteurized bovine colostrum on this VLP binding. *Bioscience, Biotechnology, Biochemistry.* 74: 541-547.2010. (片山)
- Sharp, T. M., Guix, S., Katayama K., Crawford, S. E., Estes, M. K. Inhibition of Cellular Protein Secretion by Norwalk Virus Nonstructural Protein p22 Requires a Mimic of an Endoplasmic Reticulum Export Signal. *PLoS ONE* 5: e13130, 2010. (片山)
- Oka, T., Takagi, H., Tohya, Y., Murakami, K., Takeda, N., Wakita, T., Katayama, K. Bioluminescence technologies to detect calicivirus protease activity in cell-free system and in infected cells. *Antiviral Res.* 90, 9-16, 2011. (片山)
- Oka, T., Murakami, K., Wakita, T., Katayama, K. Comparative site-directed mutagenesis in the catalytic amino acid triad in calicivirus proteases. *Microbiol Immunol.* 55; 108-14. 2011. (片山)
- Kitajima, M., Oka, T., Haramoto, E., Phanuwat, C., Takeda, N., Katayama, K., Katayama, H. Genetic diversity of genogroup IV noroviruses in wastewater in Japan. *Letters in applied microbiology.* 52; 181-4, 2011. (片山)
- Hansman, G. S., Biertumpfel, C., Georgiev, I., McLellan, J. S., Chen, L., Zhou, T., Katayama, K., Kwong, P. D. Crystal structures of GII.10 and GII.12 norovirus protruding domains in complex with histo-blood group antigens reveal details for a potential site of vulnerability. *Journal of Virology* 85, 6687-701, 2011. (片山)
- Akira Nakanishi, Takeshi Imai, and Shoichiro Tange. SV40 mutant defective in expressing Vp4 exhibits temperature-sensitive growth defect. *Virus Research* 157: 116-120 (2011) (中西)
- Mizutani, T., Sayama, Y., Nakanishi, A., Ochiai, H., Sakai, K., Wakabayashi, K., Tanaka, N., Miura, E., Oba, M., Kurane, I., Saijo, M., Morikawa, S., and Ono, S. Novel DNA virus isolated from samples showing endothelial cell necrosis in the Japanese eel, *Anguilla japonica*. *Virology* 412: 179-87 (2011) (中西)
- Tian-cheng Li, Yoshimatsu K, Yasuda SP, Arikawa J, Koma T, Kataoka M, Ami Y, Suzuki Y, Mai LT, Hoa NT, Yamashiro T, Hasebe F, Takeda N, Wakita T. Characterization of self-assembled virus-like particles of rat hepatitis E virus generated by recombinant baculoviruses. *Journal of General Virology* (2011), 92, 2830-2837. (李)
- Nakamura S, Tsuchiya H, Okahara N, Nakagawa T, Ohara N, Yamamoto H, Li T, Takeda N, Ogasawara K, Torii R. Epidemiology of Hepatitis E Virus in Indoor-Captive Cynomolgus Monkey Colony. *J Vet Med Sci.* 2011. *in press.* (李)
- Tian-Cheng Li, Xing L, Mayazaki N, Simon MN, Wall JS, Moore M, Wang CY, Takeda N, Wakita T, Miyamura T, Cheng RH. Structure of hepatitis E virion-sized particle reveals an RNA-dependent viral assembly pathway. *J Biol Chem.* 2010 285: 33175-83. (李)
- Xing L, Wang JC, Tian-Cheng Li, Yasutomi Y, Lara J, Khudyakov Y, Schofield D, Emerson SU, Purcell RH, Takeda N, Miyamura T, Cheng RH. Spatial configuration of hepatitis E virus antigenic domain. *J Virol.* 2011 85: 1117-24. (李)
- Tian-Cheng Li, Shili Song QiFa Yang, Koji Ishii, Naokazu Takeda, and Takaji Wakita. A cell culture system for hepatitis E virus. *Hepatology International.* 2011. 5(3): 202. (李、石井)
- Yamagishi Y., Shoji I., Miyagawa S., Kawakami T., Katoh T., Goto Y., Suga H. Natural product-like macrocyclic N-methyl-peptide inhibitors against a ubiquitin ligase uncovered from a ribosome-expressed de novo library. *Chemistry & Biology*, in press. (勝二)
- Deng L., Shoji I., Oawa W., Kaneda S., Soga T., Jiang D. P., Ide Y-H., and Hotta H., Hepatitis C virus infection promotes hepatic gluconeogenesis through an NS5A-mediated, FoxO1-dependent pathway. *J. Virol.* 85, 8556-68, 2011. (勝二)
- Sasayama M., Shoji I., Ide Y-H., Deng L., and Hotta H. Detection of neutralizing antibodies and nonspecific inhibitors in human sera against J6/JFH1 strain and its adaptive mutants of hepatitis C virus. *J Med Virol*, in press. (勝二)
- Nasu J, Murakami K, Miyagawa S, Ichimura T, Wakita T, Hotta, H, Miyamura T, Suzuki T, Satoh T, Shoji I. E6AP ubiquitin ligase mediates ubiquitin-dependent degradation of peroxiredoxin 1. *J Cell Bioch*, 111, 676-85, 2010 (勝二、鈴木)
- Ishii K., Kiyohara T., Yoshizaki S., Wakita T., Shimada T., Nakamura N., Nakashima K., Tada Y. and Noda M. Epidemiological and genetic analyses of a diffuse outbreak of hepatitis A in Japan, 2010. *J Clin Virol*, in press. (石井)
- Miyamura T., Ishii K., Kanda T., Tawada A., Sekimoto T., Wu S., Nakamoto S., Arai M., Fujiwara K., Imazeki F., Kiyohara T., Wakita T. and Yokosuka O. Possible widespread presence of hepatitis A virus subgenotype IIIA in Japan: recent trend of hepatitis A causing acute liver failure. *Hepatology Research*, in press (石井)
- Akazawa D, Morikawa K, Omi N, Takahashi H, Nakamura N, Mochizuki H, Date T, Ishii K., Suzuki T, Wakita T. Production and Characterization of Hepatitis C Virus Particles from Serum-free Culture. *Vaccine*, 29: 4821-4828 (2011) (石井、鈴木)
- Ishii K., Kiyohara T., Yoshizaki S., Shimada T., Nakamura N., Tada Y., Noda M. and Wakita T. Epidemiological and genetic analysis of a diffuse outbreak of hepatitis A in Japan, 2010. *Hepatology International.* 5: 204-205 (2011) (石井)

Ⅶ. Ⅲ(2年間の研究成果)の概要図等

目的

効率の良い培養細胞増殖系が確立していないために研究に制約があり感染症対策が十分でないウイルスについて、ウイルス様粒子を利用した診断技術の確立、感染増殖実験モデルの開発を行い、更に、これらの新規技術を利用したウイルス生活環解析、血清疫学解析、予防・治療法開発の基盤的研究を行う。

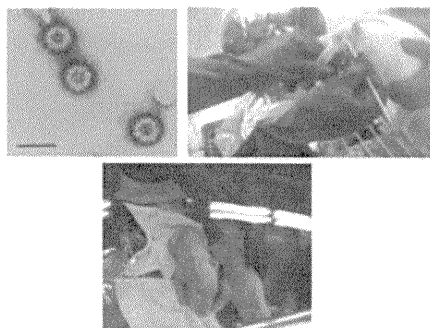
2年間の主な研究成果

ノロウイルス

サロゲートモデルとして有用なマウスウイルスの細胞馴化機序を解明。ヒトウイルスのリバースジェネティクス系とマウス感染系におけるウイルス生活環を比較解析。次世代シーケンサーを用いて、感染者中のHuNoV準種を網羅的解析(右図)。各流行年由来株のウイルス様粒子を作製、精製。近縁のネコカリシウイルスの感染性クローンを取得。

B群ロタウイルス

詳細な分子系統樹解析から遺伝子型別分類基準を整備。主要株のウイルス様粒子を作製、精製。ノバイオータを用いた感染増殖、病態モデルの確立(下図)。



パピローマウイルス

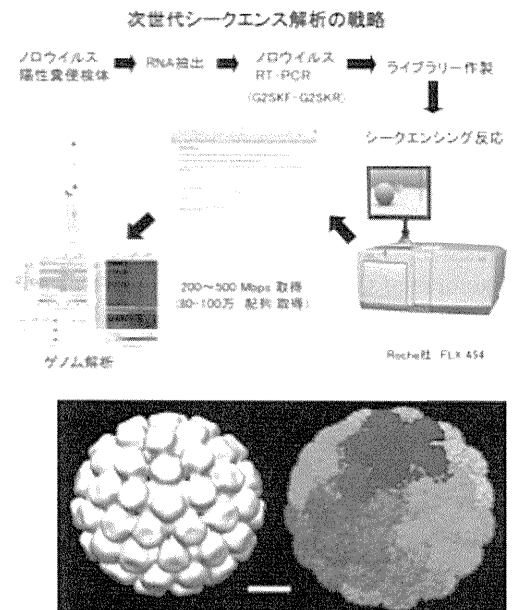
子宮頸癌特異的治療薬開発を目指し、HPV E6/E6APIによる癌化を阻害する分子を探索し、p53ユビキチン化阻害作用を有するE6AP結合性N-メチルペプチドを取得。

B型肝炎ウイルス

遺伝子型間キメラウイルス様粒子の発現解析から、HBV粒子の分泌効率決定基がPreS2翻訳開始域に点在することを証明(右図)。

E型肝炎ウイルス

遺伝子型3の感染性クローンを新たに取得。ヒト肝癌細胞株のリクローン化から、HEV吸着侵入感受性の異なる細胞クローン種を単離。

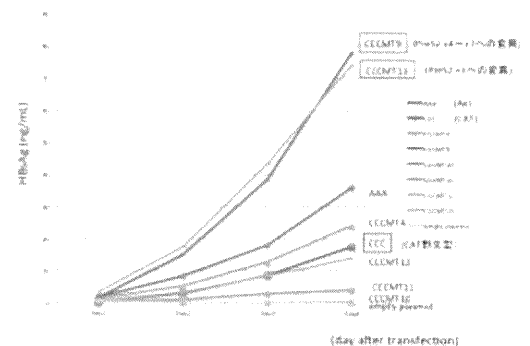


ポリオマウイルス

クラリオ電子顕微鏡観察から、MCVの粒子構造を解明(上図)。レポーター粒子感染モデルで、MCVの糖脂質糖鎖依存的感染性を解明。抗MCV抗体保有と病態との関連を解析。KIV, WUVのレポーター粒子感染系を作製し感染支持細胞を取得。KIV, WUVのウイルス様粒子を作製、精製し、抗体検出系を確立、我が国健康人の抗体保有率を明らかにした。

ボカウイルス

各遺伝子型(1~4)のウイルス様粒子を作製、精製、抗体診断系を確立。小児疾患との関連解析のため東京慈恵医大と共同研究開始(倫理委員会承認済み)。



今後の課題

所得したウイルス様粒子を用いて樹立した抗体診断系による血清疫学的解析
作製したモデルシステム等による生活環、病態発現機構解析
遺伝子・抗原抗体診断系の実用化、治療法開発へ向けた技術向上

●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～平成22年3月
浜松医科大学医学部	教授	平成22年4月～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：脇田隆宇

・主な研究課題

C型肝炎ウイルス(HCV)の研究

HCV 蛋白プロセッ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 プロセッシングに関する研究

ヒトポリオーマウイルスの感染、粒子形成機構に関する研究

ユビキチン化蛋白の選択的分解機構に関する研究

細胞分化誘導物質の探索

これまでの研究実績

Saeed M, Suzuki R, Watanabe N, Masaki T, Tomonaga M, Muhammad A, Kato T, Matsuura Y, Watanabe H, Wakita T, Suzuki T. Role of the ERAD pathway in degradation of hepatitis C virus envelope proteins and production of the viral particles. *J Biol Chem* 286: 37264-37273, 2011.

Yamamoto M, Aizaki H, Fukasawa M, Teraoka T, Miyamura T, Wakita T, Suzuki T. Structural requirements of virion-associated cholesterol for infectivity, buoyant density and apolipoprotein association of hepatitis C virus. *J Gen Virol*. 92: 2082-2087, 2011.

Saeed M, Shiina M, Date T, Akazawa D, Watanabe N, Murayama A, Suzuki T, Watanabe H, Hiraga N, Imamura M, Chayama K, Choi Y, Krawczynski K, Liang TJ, Wakita T, Kato T. In Vivo adaptation of hepatitis C virus for efficient virus production and evasion of apoptosis. *Hepatology* 54: 425-433, 2011.

Inoue Y, Aizaki H, Hara H, Matsuda M, Ando T, Shimoji T, Masaki T, Shoji I, Homma S, Matsuura Y, Miyamura T, Wakita T, Suzuki T. Chaperonin TRiC/CCT participates in replication of hepatitis C virus genome via interaction with the viral NS5B protein. *Virology* 410: 38-47, 2011.

Akazawa D, Morikawa K, Omi N, Takahashi H, Nakamura N, Mochizuki H, Date T, Ishii K, Suzuki T, Wakita T. Production and characterization of HCV particles from serum-free culture. *Vaccine* 29: 4821-4828, 2011.

Honda M, Takehana K, Sakai A, Tagata Y, Shirasaki T, Nishitani S, Muramatsu T, Yamashita T, Nakamoto Y, Mizukoshi E, Sakai Y, Yamashita T, Nakamura M, Shimakami T, Yi M, Lemon SM, Suzuki T, Wakita T, Kaneko S. Malnutrition Impairs Interferon Signaling Through mTOR and FoxO Pathways in Patients With Chronic Hepatitis C. *Gastroenterology* 141: 128-140, 2011.

Suzuki T. Assembly of hepatitis C virus particles. *Microbiol Immunol*. 55: 12-18, 2011.

Watanabe N, Aizaki H, Matsuura T, Kojima S, Wakita T, Suzuki T. Hepatitis C virus RNA replication in human stellate cells regulates gene expression of extracellular matrix-related molecules. *Biochem Biophys Res Commun*. 407: 135-140, 2011.

- Wen X, Abe T, Kukihara H, Taguwa S, Mori Y, Tani H, Kato N, Suzuki T, Tatsumi M, Moriishi K, Matsuura Y. Elimination of hepatitis C virus from hepatocytes by a selective activation of therapeutic molecules. *PLoS One*. 6: e15967, 2011.
- Miyoshi H, Moriya K, Tsutsumi T, Shinzawa S, Fujie H, Shintani Y, Fujinaga H, Goto K, Todoroki T, Suzuki T, Miyamura T, Matsuura Y, Yotsuyanagi H, Koike K. Pathogenesis of lipid metabolism disorder in hepatitis C: polyunsaturated fatty acids counteract lipid alterations induced by the core protein. *J Hepatol*. 54: 432-438, 2011.
- Masaki T, Suzuki R, Saeed M, Mori K, Matsuda M, Aizaki H, Ishii K, Maki N, Miyamura T, Matsuura Y, Wakita T, Suzuki T. Production of infectious hepatitis C virus by using RNA polymerase. I-mediated transcription. *J Virol* 84: 5824-5835, 2010.**
- Moriishi K, Shoji I, Mori Y, Suzuki R, Suzuki T, Kataoka C, Matsuura Y. Involvement of PA28gamma in the propagation of hepatitis C virus. *Hepatology*. 252; 411-420, 2010.**
- Murayama A, Weng L, Date T, Akazawa D, Tian X, Suzuki T, Kato T, Tanaka Y, Mizokami M, Wakita T, Toyoda T. RNA polymerase activity and specific RNA structure are required for efficient HCV replication in cultured cells. *PLOS Pathog*. 6; e1000885, 2010.**
- Nasu J, Murakami K, Miyagawa S, Yamashita R, Ichimura T, Wakita T, Hotta H, Miyamura T, Suzuki T, Satoh T, Shoji I. E6AP ubiquitin ligase mediates ubiquitin-dependent degradation of peroxiredoxin 1. *J Cell Biochem*. 111: 676-685, 2010.
- Takahashi H, Akazawa D, Kato T, Date T, Shirakura M, Nakamura N, Mochizuki H, Tanaka-Kaneko K, Sata T, Tanaka Y, Mizokami M, Suzuki T, Wakita T. Biological properties of purified recombinant HCV particles with an epitope-tagged envelope. *Biochem Biophys Res Commun*. 395: 565-571, 2010.
- Hmwe SS, Aizaki H, Date T, Murakami K, Ishii K, Miyamura T, Koike K, Wakita T, Suzuki T: Identification of hepatitis C virus genotype 2a replicon variants with reduced susceptibility to ribavirin. *Antiviral Res* 85: 520-524, 2010.**
- Nitahara-Kasahara Y, Fukasawa M, Shinkai-Ouchi F, Sato S, Suzuki T, Murakami K, Wakita T, Hanada K, Miyamura T, Nishijima M: Cellular vimentin content regulates the protein level of Hepatitis C virus core protein and the Hepatitis C virus production in cultured cells. *Virology* 383: 319-327, 2009.
- Hara H, Aizaki H, Matsuda M, Shinkai-Ouchi F, Inoue Y, Murakami K, Shoji I, Kawakami H, Matsuura Y, Lai MMC, Miyamura T, Wakita T, Suzuki T: Involvement of creatine kinase B in hepatitis C virus genome replication through interaction with the viral NS4A protein. *J Virol* 83: 5137-5147, 2009.
- 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.
- Kukihara H, Moriishi K, Taguwa S, Tani H, Abe T, Mori Y, Suzuki T, Fukuhara T, Taketomi A, Maehara Y, Matsuura Y: Human VAP-C negatively regulates hepatitis C virus propagation. *J Virol* 83: 7959-7969, 2009.
- Tsutsumi T, Matsuda M, Aizaki H, Moriya K, Miyoshi H, Fujie H, Shintani Y, Yotsuyanagi H, Miyamura T, Suzuki T, Koike K: Proteomics analysis of mitochondrial proteins reveals overexpression of a mitochondrial protein chaperone, prohibitin, in cells expressing hepatitis C virus core protein. *Hepatology* 50: 378-386, 2009.
- Shimoji T, Murakami K, Sugiyama Y, Matsuda M, Inubushi S, Nasu J, Shirakura M, Suzuki T, Wakita T, Kishino T, Hotta H, Miyamura T, Shoji I: Identification of Annexin A1 as a novel substrate for E6AP-mediated ubiquitylation. *J Cell Biochem* 16: 1123-1135, 2009.
- Moriya K, Miyoshi H, Tsutsumi T, Shinzawa S, Fujie H, Shintani Y, Yotsuyanagi H, Moriishi K, Matsuura Y, Suzuki T, Miyamura T, Koike K. Tacrolimus ameliorates metabolic disturbance and oxidative stress caused by hepatitis C virus core protein: analysis using mouse model and cultured cells. *Am J Pathol*. 175: 1515-1524, 2009.
- Murakami Y, Noguchi K, Yamagoe S, Suzuki T, Wakita T, Fukasawa H: Identification of bisindolylmaleimides and indolocarbazoles as inhibitors of HCV replication by tube-capture-RT-PCR. *Antiviral Res* 83: 112-117, 2009.
- Taguwa S, Kambara H, Omori H, Tani H, Abe T, Mori Y, Suzuki T, Yoshimori T, Moriishi K, Matsuura Y: Co-chaperone activity of human butyrate-induced transcript 1 facilitates hepatitis C virus replication through an Hsp90-dependent pathway. *J Virol* 83: 10427-10436, 2009.
- Saeed M, Suzuki R, Kondo M, Aizaki H, Kato T, Mizuochi T, Wakita T, Watanabe H, Suzuki T: Evaluation of hepatitis C virus core antigen assays in detecting recombinant viral antigens of various genotypes. *J Clin Microbiol* 47: 4141-4143, 2009.
- Aizaki H, Morikawa K, Fukasawa M, Hara H, Inoue Y, Tani H, Saito K, Nishijima M, Hanada K, Matsuura Y, Lai

- MMC, 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.
- 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.
- Okamoto K, Mori Y, Komoda Y, Okamoto T, Okochi M, Takeda M, Suzuki T, Moriishi K, Matsuura Y: Intramembrane processing by signal peptide peptidase regulates the membrane localization of hepatitis C virus core protein and viral propagation. *J Virol* 82: 8349-8361, 2008.
- Omata K, Suzuki R, Masaki T, Miyamura T, Satoh T, Suzuki T: Identification and characterization of the human inhibitor of caspase-activated DNase gene promoter. *Apoptosis* 13: 929-937, 2008.
- Murakami K, Kimura T, Osaki M, Ishii K, Miyamura T, Suzuki T, Wakita T, Shoji I: Virological characterization of HCV JFH-1 strain in lymphocytic cell lines. *J Gen Virol* 89: 1587-1592, 2008.
- Okamoto T, Omori H, Kaname Y, Abe T, Nishimura Y, Suzuki T, Miyamura T, Yoshimori T, Moriishi K, Matsuura Y: A single amino acid mutation in hepatitis C virus NS5A disrupting FKBP8 interaction impairs viral replication. *J Virol* 82: 3480-3489, 2008.
- Taguwa S, Okamoto T, Abe T, Mori Y, Suzuki T, Moriishi K, Matsuura Y: Human butyrate-induced transcript 1 interacts with hepatitis C virus NS5A and regulates viral replication. *J Virol* 82: 2631-2641, 2008.
- Murakami K, Inoue Y, Hmwe SS, Omata K, Hongo T, Ishii K, Yoshizaki S, Aizaki H, Matsuura T, Shoji I, Miyamura T, 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.
- 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.
- Shimoike T, Koyama C, Murakami K, Suzuki R, Matsuura Y, Miyamura T, Suzuki T: 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* 345: 434-445, 2006.
- Moriishi K, Mochizuki R, Moriya K, Miyamoto H, Mori Y, Abe T, Murata S, Tanaka K, Miyamura T, Suzuki T, Koike K, Matsuura Y: Critical role of PA28gamma in hepatitis C virus-associated steatogenesis and hepatocarcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 104: 1661-1666, 2007.
- Miyamoto H, Moriishi K, Moriya K, Murata S, Tanaka K, Suzuki T, Miyamura T, Koike K, Matsuura Y: Involvement of the PA28gamma-dependent pathway in insulin resistance induced by hepatitis C virus core protein. *J Virol* 81: 1727-1735, 2007.
- 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.
- Suzuki T, Ishii K, Aizaki H, Wakita T: Hepatitis C viral life cycle. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 59: 1200-1212, 2007.
- Suzuki T, Aizaki H, Murakami K, Shoji I, Wakita T: Molecular biology of hepatitis C virus. *J. Gastroenterol.* 42: 411-23, 2007.
- Ishii K, Hasegawa H, Nagata N, Mizutani T, Morikawa S, Suzuki T, Taguchi F, Tashiro M, Takemori T, Miyamura T, Tsunetsugu-Yokota Y: Induction of protective immunity against severe acute respiratory syndrome coronavirus (SARS-CoV) infection using highly attenuated recombinant vaccinia virus DIs. *Virology* 351: 368-380, 2006.
- Murakami K, Ishii K, Ishihara Y, Yoshizaki S, Tanaka K, Gotoh Y, Aizaki H, Kohara M, Yoshioka H, Mori Y, Manabe N, Shoji I, Sata T, Bartenschlager R, Matsuura Y, Miyamura T, Suzuki T: Production of infectious hepatitis C virus particles in three-dimensional cultures of the cell line carrying the genome-length dicistronic viral RNA of genotype 1b. *Virology* 351: 381-392, 2006.
- Masaki T, Matsuura T, Ohkawa K, Miyamura T, Okazaki I, Watanabe T, Suzuki T: All-trans retinoic acid down-regulates human albumin gene expression through the induction of C/EBPbeta-LIP. *Biochem J* 397:345-53, 2006.
- Baek K-H, Park H-Y, Kang C-M, Kim S-J, Jeong S-J, Hong E-K, Park J-W, Sung Y-C, Suzuki T, Kim C-M, Lee

- C-W: Overexpression of hepatitis C virus NS5A protein induces chromosome instability via mitotic cell cycle dysregulation. *J Mol Biol* 359: 22-34, 2006.
- Suzuki T, Suzuki R. Maturation and assembly of hepatitis C virus core protein. *In: Molecular Biology of the Flavivirus*. Horizon bioscience. U.K. pp. 295-312, 2006.
- Okamoto T, Nishimura Y, Ichimura T, Suzuki K, Miyamura T, Suzuki T, Moriishi K, Matsuura Y; Hepatitis C virus RNA replication is regulated by FKBP8 and Hsp90. *EMBO J* 25: 5015-25, 2006.
- Nakai K, Okamoto T, Kimura-Someya T, Ishii K, Lim CK, Tani H, Matsuo E, Abe T, Mori Y, Suzuki T, Miyamura T, Nunberg JH, Moriishi K, Matsuura Y: Oligomerization of hepatitis C virus core protein is crucial for interaction with cytoplasmic domain of E1 envelope protein. *J Virol* 80: 11265-11273, 2006.
- Suzuki R, Sakamoto S, Tsutsumi T, Rikimaru A, Tanaka K, Shimoike T, Moriishi K, Iwasaki T, Mizumoto K, Matsuura Y, Miyamura T, Suzuki T: Molecular determinants for subcellular localization of hepatitis C virus core protein. *J Virol* 79: 1271-1281, 2005.
- Hamamoto I, Nishimura Y, Okamoto T, Aizaki H, Liu M, Mori Y, Abe T, Suzuki T, Lai MM, Miyamura T, Moriishi K, Matsuura Y: Human VAP-B is involved in hepatitis C virus replication through interaction with NS5A and NS5B. *J Virol* 79: 13473-13482, 2005.
- Suzuki T, Omata K, Satoh T, Miyasaka T, Arai C, Maeda M, Matsuno T, Miyamura T: Quantitative detection of hepatitis C virus (HCV) RNA in saliva and gingival crevicular fluid of HCV-infected patients. *J Clin Microbiol* 43: 4413-4417, 2005.
- Masumi A, Aizaki H, Suzuki T, DuHadaway JB, Prendergast GC, Komuro K, Fukazawa H: Reduction of hepatitis C virus NS5A phosphorylation through its interaction with amphiphysin II. *Biochem Biophys Res Commun* 336: 572-8, 2005.
- Miyoshi H, Fujie H, Shintani Y, Tsutsumi T, Shinzawa S, Makuuchi M, Kokudo N, Matsuura Y, Suzuki T, Miyamura T, Moriya K, Koike K: Hepatitis C virus core protein exerts an inhibitory effect on suppressor of cytokine signaling (SOCS)-1 gene expression. *J Hepatol* 43: 757-63, 2005.
- Suzuki T, Suzuki R, Li J, Hijikata M, Matsuda M, Li T-C, Matsuura Y, Mishiro S, Miyamura T: Identification of basal promoter and enhancer elements in an untranslated region of the TT virus genome. *J Virol* 78: 10820-10824, 2004
- Tsutsumi T, Suzuki T, Moriya K, Shintani Y, Fujie H, Miyoshi H, Matsuura Y, Koike K, Miyamura T: Hepatitis C virus core protein activates ERK and p38 MAPK in cooperation with ethanol in transgenic mice. *Hepatology* 38: 820-828, 2003.
- Sacco R, Tsutsumi T, Suzuki R, Otsuka M, Aizaki H, Sakamoto S, Matsuda M, Seki N, Matsuura Y, Miyamura T, Suzuki T: Anti-apoptotic regulation by hepatitis C virus core protein through up-regulation of inhibitor of caspase-activated DNase. *Virology* 317: 24-35, 2003.
- Brunetti CR, Amano H, Ueda Y, Miyamura T, Suzuki T, Li X, Barrett JW, McFadden G: The complete genomic sequence and comparative analysis of the human tumorigenic poxvirus Yaba monkey tumor virus. *J Virol* 77: 13335-13347, 2003.
- Iwahori T, Matsuura T, Maehashi H, Sugo K, Saito M, Hosokawa M, Chiba K, Masaki T, Aizaki H, Ohkawa K, Suzuki T: CYP3A4 inducible model for in vitro analysis of human drug metabolism using a bioartificial liver. *Hepatology* 37: 665-673, 2003.
- Aizaki H, Nagamori S, Matsuda M, Kawakami H, Hashimoto O, Ishiko H, Kawada M, Matsuura T, Hasumura S, Matsuura Y, Suzuki T, Miyamura T: Production and release of infectious hepatitis C virus from human liver cell cultures in the three-dimensional radial-flow bioreactor. *Virology* 314: 16-25, 2003.
- Otsuka M, Aizaki H, Kato N, Suzuki T, Miyamura T, Omata M, Seki N: Differential cellular gene expression induced by hepatitis B and C viruses. *Biochem Biophys Res Commun* 300: 443-447, 2003.
- Tsutsumi T, Suzuki T, Moriya K, Shintani Y, Fujie H, Miyoshi H, Matsuura Y, Koike K, Miyamura T: Hepatitis C virus core protein activates ERK and p38 MAPK in cooperation with ethanol in transgenic mice. *Hepatology* 38: 820-828, 2003.
- Moriishi K, Okabayashi T, Nakai K, Moriya K, Koike K, Murata S, Chiba T, Tanaka K, Suzuki R, Suzuki T, Miyamura T, Matsuura Y: Proteasome activator PA28gamma-dependent nuclear retention and degradation of hepatitis C virus core protein. *J Virol* 77: 10237-10249, 2003.
- Aizaki H, Otsuka M, Matsuda M, Li YW, Harada T, Kawakami H, Seki N, Matsuura Y, Miyamura T, Suzuki T: Expression profiling of liver cell lines expressing entire or parts of hepatitis C virus open reading frame. *Hepatology*

36: 1431-1438, 2002.

Tsutsumi T, Suzuki T, Moriya K, Yotsuyanagi H, Shintani Y, Fujie H, Matsuura Y, Kimuta S, Koike K, Miyamura T: Intrahepatic cytokine expression and AP-1 activation in mice with transgene for hepatitis C virus core protein. *Virology* 304: 415-424, 2002.

Tsutsumi T, Suzuki T, Shimoike T, Suzuki R, Moriya K, Shintani Y, Fujie H, Matsuura Y, Koike K, Miyamura T: Interaction of hepatitis C virus core protein with retinoid X receptor - α modulates its transcriptional activity. *Hepatology* 35: 937-946, 2002.

Suzuki R, Tamura K, Li J, Ishii K, Matsuura Y, Miyamura T, Suzuki T: Ubiquitin-mediated degradation of hepatitis C virus core protein is regulated by processing at its carboxyl terminus. *Virology* 280: 301-309, 2001.

Takikawa S, Ishii K, Aizaki H, Suzuki T, Asakura H, Matsuura Y, Miyamura T: Cell fusion activity of HCV envelope proteins. *J Virol* 74: 5066-5074, 2000.

Tanaka Y, Shimoike T, Ishii K, Suzuki R, Suzuki T, Ushijima H, Matsuura Y, Miyamura T: Selective binding of HCV core protein to synthetic oligonucleotides. *Virology* 270: 229-236, 2000.

Shoji I, Suzuki T, Sato M, Aizaki H, Chiba T, Matsuura Y, Miyamura T: Internal processing of hepatitis C virus NS3 protein. *Virology* 254: 315-323, 1999.

Suzuki T, Varshavsky A: Degradation signals in the lysine-asparagine sequence space. *EMBO J* 18: 6017-6026, 1999.

Aizaki H, Aoki Y, Harada T, Ishii K, Suzuki T, Nagamori S, Toda G, Matsuura Y, Miyamura T: Full-length complementary DNA of hepatitis C virus genome from an infectious blood sample. *Hepatology* 27: 621-627, 1998.

Aizaki H, Saito A, Kusakawa I, Ashiwaru Y, Nagamori S, Toda G, Suzuki T, Ishii K, Matsuura Y, Miyamura T: Mother-to-child transmission of a hepatitis C virus variant with an insertional mutation in its hypervariable region. *J Hepatol* 25: 608-613, 1996.

Harada T, Kim DW, Sagawa K, Suzuki T, Takahashi K, Saito I, Matsuura Y, Miyamura T: Characterization of an established human hepatoma cell line constitutively expressing non-structural protein of hepatitis C virus by transfection of viral cDNA. *J Gen Virol* 76: 1215-1221, 1995.

Suzuki R, Matsuura Y, Suzuki T, Ando A, Chiba J, Harada S, Saito I, Miyamura T: Nuclear localization of the truncated hepatitis C virus core protein with its hydrophobic C terminus deleted. *J Gen Virol* 76: 53-61, 1995.

Suzuki T, Sato M, Chieda S, Shoji I, Harada T, Yamakawa Y, Watabe S, Matsuura Y, Miyamura T: In vivo and in vitro trans-cleavage activity of hepatitis C virus serine proteinase expressed by recombinant baculoviruses. *J Gen Virol* 76: 3021-3029, 1995.

Shoji I, Suzuki T, Chieda S, Sato M, Harada T, Chiba T, Matsuura Y, Miyamura T: Proteolytic activity of NS3 serine proteinase of hepatitis C virus efficiently in *Escherichia Coli*. *Hepatology* 22: 1648-1655, 1995.

Koike K, Moriya K, Ishihashi K, Matsuura Y, Suzuki T, Saito I, Iino S, Kurokawa K, Miyamura T: Expression of hepatitis C envelope proteins in transgenic mice. *J Gen Virol* 76: 3031-3038, 1995.

Matsuura Y, Suzuki T, Suzuki R, Sato M, Aizaki H, Saito I, Miyamura T: Processing of E1 and E2 glycoproteins of hepatitis C virus expressed in mammalian and insect cells. *Virology* 205: 141-150, 1994.

Harada S, Watanabe Y, Takeuchi K, Suzuki T, Katayama T, Takebe Y, Saito I, Miyamura T: Expression of processed core protein of hepatitis C virus in mammalian cells. *J Virol* 65: 3015-3021, 1991.

Suzuki T, Kajino K, Masui N, Saito I, Miyamura T: Alternative splicing of hepatitis B virus RNAs in HepG2 cells transfected with the viral DNA. *Virology* 179: 881-885, 1990.

Suzuki T, Masui N, Kajino K, Saito I, Miyamura T: Detection and mapping of spliced RNA from a human hepatoma cell line transfected with the hepatitis B virus genome. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 8422-8426, 1989.

Suzuki T, Oka H, Okura A, Asahi K: In vitro and in vivo effects of differanisole A on some tumor cells. *J Antibiotics* 39: 869-871, 1986.

感染性 C 型肝炎ウイルス粒子高産生系 PCT/2006/JP319572

新規 RNA 結合ペプチド PCT/JP2006/320991

C 型肝炎ウイルス粒子及びその増殖法 PCT/JP2006/304223

新規組換え型ヒト C 型肝炎ウイルス粒子とその産生方法 PCT/JP 2006/319573

培養細胞感染系の確立されていない病原体の実験技術の開発と予防診断法に関する研究

研究目的

効率の良い培養細胞での感染増殖系が確立されていないため研究に制約があり、感染症対策が十分でないウイルスについて診断技術の確立、感染増殖実験モデルの開発を行い、更に、これらの新規技術を利用したウイルス生活環の解析、血清疫学解析、予防治療法開発の基盤研究を行う。

研究計画

抗原抗体診断系の開発と血清疫学解析、分子疫学解析
 - 組換えバキュロウイルス構築、ウイルス様粒子調製
 - ELISA系による血清疫学解析 (新規ポリオーマウイルス、ポカウイルス、B群ロタウイルス)
 - 遺伝子型別分類基準作製 (B群ロタウイルス)

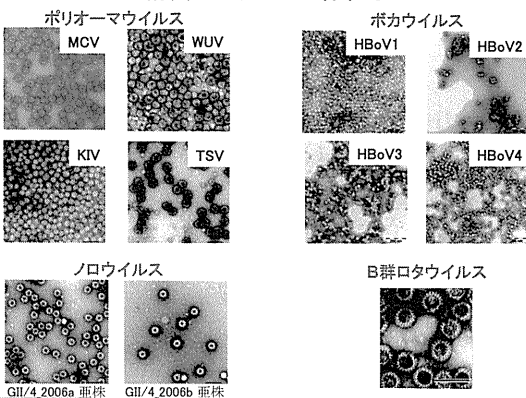
実験モデルの開発とウイルス生活環の解析

- 近縁ウイルスモデルの作製、複製制御機構の解析 (ノロウイルス)
 - 感染増殖モデルの作製、病態解析 (B群ロタウイルス)
 - シュードピリオンを利用した感染機構解析、粒子構造解析 (新規ポリオーマウイルス)
 - 汎用性の高い増殖系の開発 (E型肝炎ウイルス)

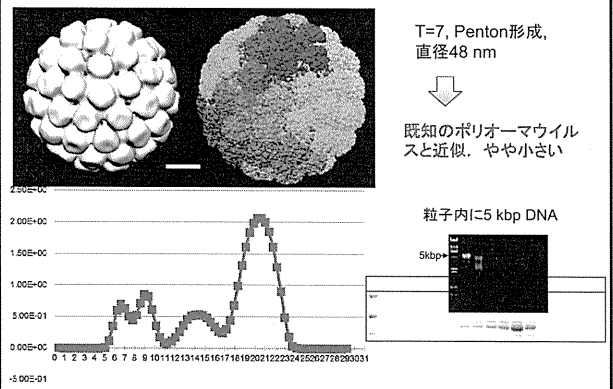
予防・治療法開発のための基盤研究

- 感染伝播の実態、流行機序の解明 (ノロウイルス)
 - シュードピリオン感染系による中和抗体解析 (新規ポリオーマウイルス)
 - 全遺伝子型に有効なワクチンの開発 (B型肝炎ウイルス)
 - 子宮頸癌に対する創薬研究 (パピローマウイルス)

組換えバキュロウイルスを利用して作製し、精製したウイルス様粒子

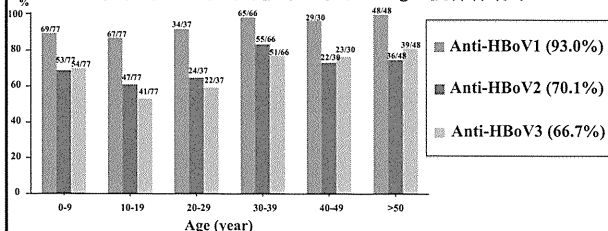


クライオ電子顕微鏡によるメルケル細胞ポリオーマウイルスの立体構造解析



抗原抗体診断系の開発と血清疫学解析

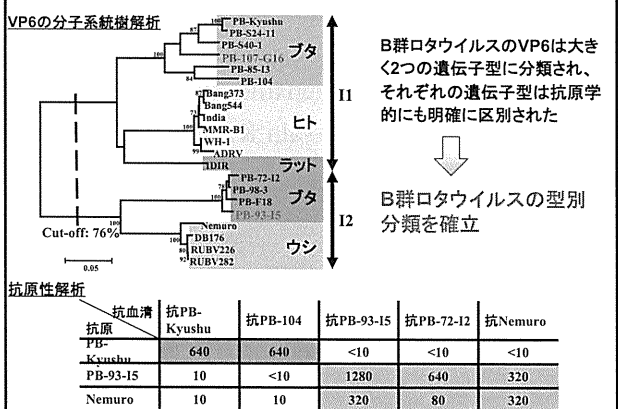
我が国健康人における抗ポカウイルスIgG抗体保有率



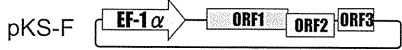
進行中

- ✓ ポリオマウイルス (WUV, KIV, TSV)、ポカウイルス (HBoV1, HBoV2, HBoV3, HBoV4) の初感染時間関連疾患の解析：小児症例を用いたウイルス遺伝子、IgM/IgG抗体解析
- ✓ ノロウイルスGI/4株の周期的流行の解析：2006-2009年流行株由来ノロウイルス様粒子を抗原として、過去に流行したノロウイルス変株に対する抗IgA抗体を解析

B群ロタウイルスの遺伝子分類と抗原性解析

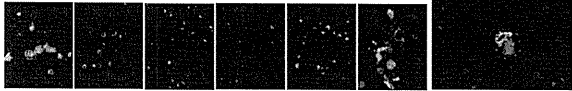


リバースジェネティクスによるヒトノロウイルス 産生系の作製



Cleaved functional NS proteins
(N-term, NTPase, 3A, VPg, Pro, RdRp)

VP1, VP2

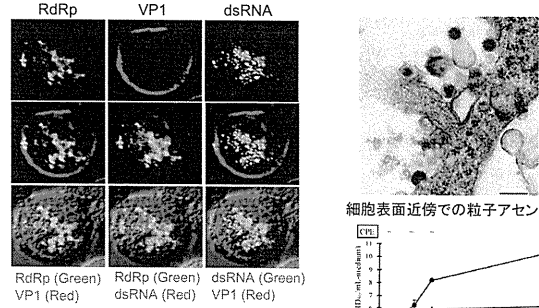


in COS7, 293T, Huh7 cells

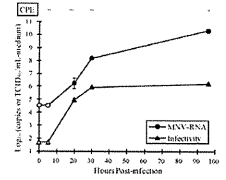


← 産生されたノロウイルス粒子。
しかしながら、感染性は未確認。

マウスノロウイルスの感染増殖動態の解析



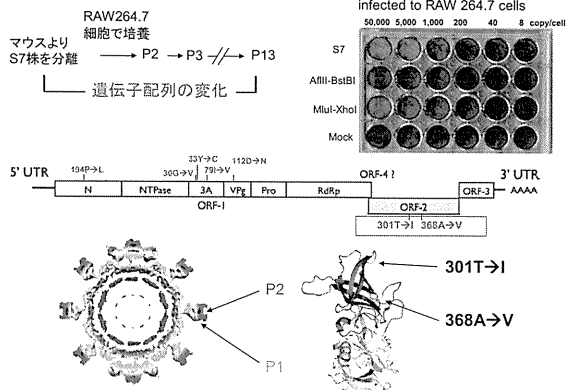
細胞表面近傍での粒子アセンブリー



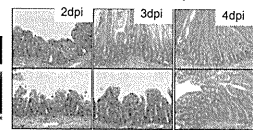
感染6時間後から粒子放出

ライフサイクルの諸過程をヒト
ノロウイルスと比較解析する。

ノロウイルスの細胞馴化に関するアミノ酸変異の同定



トバイオートプタを利用したB群ロタウイルスの感染 増殖、病態モデルの確立



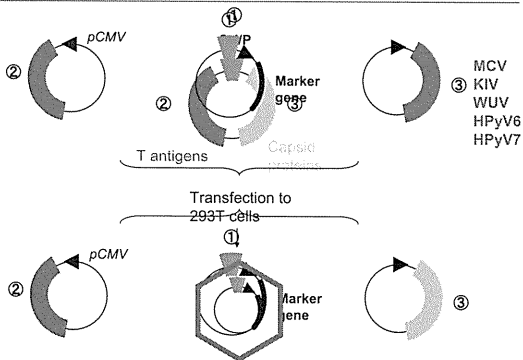
空腸における病変
感染2日後で絨毛の萎縮・消失あるいは上皮細胞の壊死・脱落が認められ、その後回復。

株	dpi	十二指腸	空腸上部	空腸中部	空腸下部	回腸上部	回腸下部	所見
PB-93-15	2	-	++	++	+	+	-	
PB-93-15	3	-	+	+	-	-	-	
PB-93-15	6	-	-	-	-	-	-	
PB-93-15	6	-	-	-	-	-	-	
PB-107-G16	2	+	++	++	++	++	++	
PB-107-G16	3	+	++	++	+	+	+	
PB-107-G16	4	+	++	+	+	+	+	死亡
PB-107-G16	5	-	-	-	-	-	-	死亡
非感染対照	2	-	-	-	-	-	-	
非感染対照	3	-	-	-	-	-	-	
非感染対照	6	-	-	-	-	-	-	

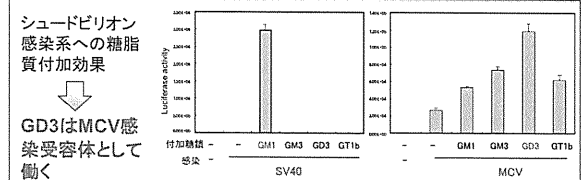
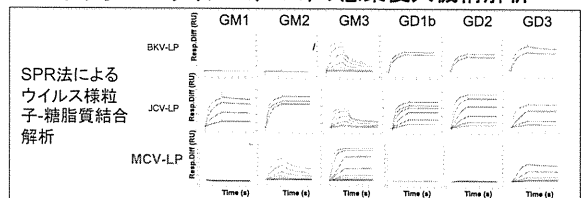
+ : 絨毛の萎縮・消失、上皮細胞の壊死・脱落あり

遺伝子型、抗原性の異なるB群ロタウイルス株は、
病原性も異なることが示された

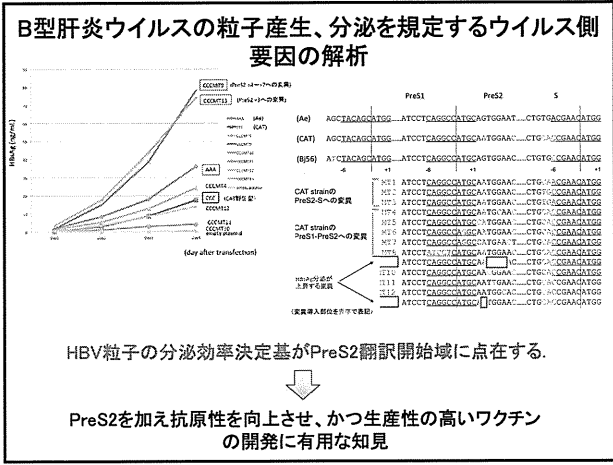
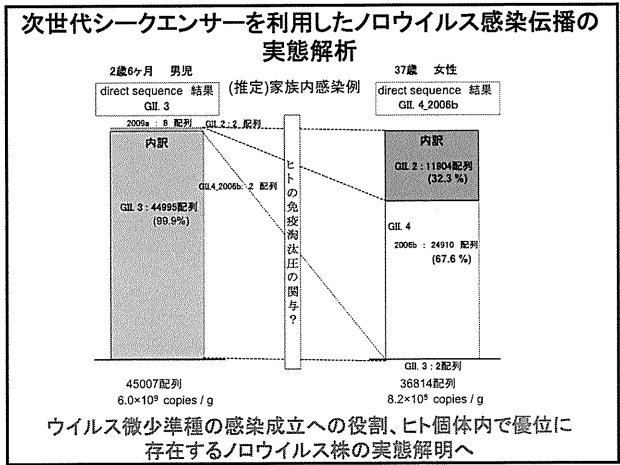
新規ヒトポリオーマウイルスのカプシドで形成された レポーターベクター(シュードビリオン)作製系の確立



ウイルス様粒子及びシュードビリオンを用いたメルケル細胞 ポリオーマウイルス(MCV)の感染侵入機構解析



シュードビリオン
感染系への糖脂
質付加効果
↓
GD3はMCV感
染受容体として
働く



- ### 主な次年度計画
- 取得したウイルス様粒子を用いた抗体診断系による血清疫学的解析
 - 樹立したモデルシステム等によるウイルス生活環、病態発現機構の解析
 - 感染細胞系の作製へ向けた、感受性細胞の取得

平成 23 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：抗菌剤治療により寛解する難治性炎症性腸疾患患者の網羅的細菌叢解析と
病因・増悪因子細菌群の解明

課題番号：H22-新興-若手-019

予定期間：H22年度からH24年度まで

研究代表者：黒田 誠

所属研究機関：国立感染症研究所

所属部局：病原体ゲノム解析研究センター

職名：センター長

年次別研究費(交付決定額)：1年目 2,000,000 円 2年目 1,700,000 円

I. 研究の意義

(1) 潰瘍性大腸炎 (UC) は、個有の遺伝的背景と腸内細菌叢が密接に関連して発症する事が示唆されている。

(2) 三種の抗菌剤 (アモキシシリン/テトラサイクリン/メトロニダゾール) を二週間投薬するだけで、その疾患が1年以上緩解することが明らかとなってきた。

(3) 抗菌薬治療による有効性の理由を詳細に把握出来ていない。

：

II. 研究の目的、期待される成果

(1) UC 発症の環境要因となる細菌叢を網羅的解読法にて定量化し、本疾患の発症機序を環境要因の側から理解する。

(2) UC 発症に関与する細菌種の同定により、より有効な抗菌薬の選択を提起できる。

(3)

：

III. 2年間の研究成果

※この期間にどのような成果があったか、研究代表者、研究分担者毎に、できるだけわかりやすく具体的に記述してください。

・ 研究代表者

(1) 腸内細菌フローラを次世代シーケンサーで網羅・定量解析するためのシステムを構築した。

(2) 腸内細菌フローラを判別するための 16S-rDNA データベースを構築した。

(3) UC 発症患者の抗菌薬治療前後の糞便に内在する細菌種を定量化・特定した。

：

・ 研究分担者(〇〇〇〇)

- (1)
- (2)
- :

IV. 平成 24 年度の課題

- (1) UC 患者特有の細菌種が同定された場合、患者菌株を単離し、動物実験等において発症に関与するかどうか検討する。
- :

V. 行政施策への貢献の可能性

- (1) UC 発症に係る関与因子を解明できる。
- (2) ステロイド抵抗性 UC 患者への代替治療法として抗菌薬治療を科学的に提言することができる。
- (3) より有効な抗菌薬選択の基礎データとなりうる。
- :

VI. 本研究の成果(発表論文・ガイドライン・マニュアル等)

※本研究費において行った研究に対するもののみを記載してください。

※研究代表者、研究分担者、研究協力者ごとに、発表論文名・学協会誌名・発表年(西暦)、知的財産権の取得及び申請状況、ガイドライン名・作成主体・策定年月日等を記載して下さい。

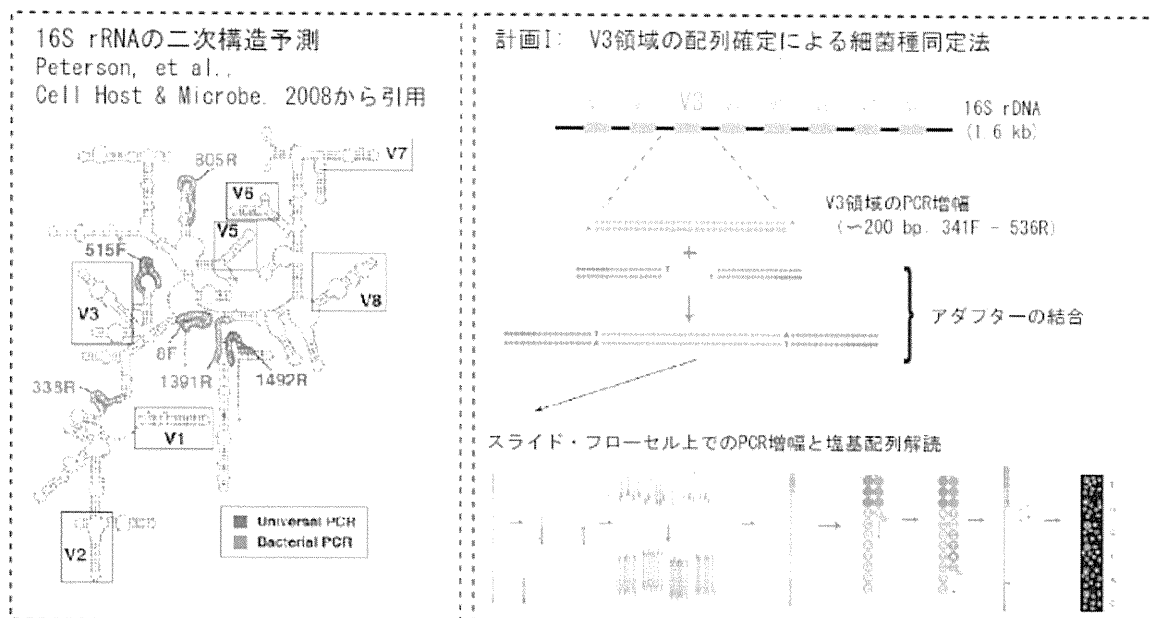
※執筆者全員を明記し、当該研究者名に下線を引いてください。

- (1) 無し
- (2)
- (3)
- :

Ⅶ. Ⅲ(2年間の研究成果)の概要図等

※ポンチ絵等でわかりやすく簡潔に説明してください。

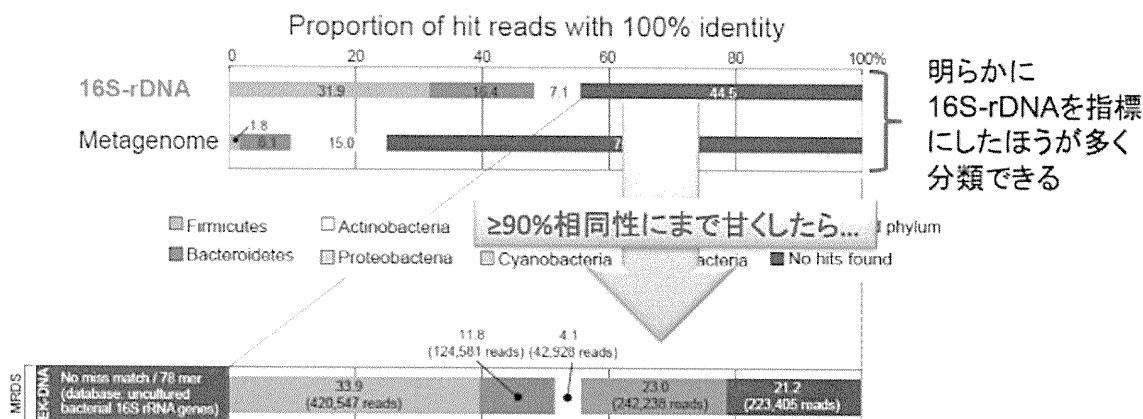
16S-rDNAを元にした網羅的細菌叢解析



80 merのリードを 1000万本解読

従来の16S-rDNAを元にした細菌フロー解析法では、 10^{11} 菌/gの菌数を有する腸内細菌フローラの氷山の一角しか検討されてこなかった。本研究課題により、 $\sim 10^4$ 菌/gの検出感度まで深く解析・同定できる方法を開発した。

16S-rDNAを指標にした細菌フロー解析



16S-rDNAを指標にした場合と、網羅的解読によるメタゲノム解析法とで比較検討した。16S-rDNAを指標にしたほうが多くの細菌種を同定することができ、16S-rDNAデータベースによる判定のほうが好ましいことが分かった。この結果は、現状の細菌ゲノム・データベース(Microbiome)は未だ不十分であり、網羅的な細菌種の特定のためにはより広範なデータベース策定が必須であることを示している。

●研究代表者の研究歴等

※研究代表者に関するもののみを記載してください。(研究代表者には下線をつけて下さい)

・過去に所属した研究機関の履歴

筑波大学大学院博士課程医学研究科生物系専攻	平成11年3月修了	博士(医学)	取得
順天堂大学医学部細菌学	助手	自 平成11年4月	
		至 平成15年3月	4年
ワシントン大学・微生物学	ポスドクトラルフェロー	自 平成15年4月	
		至 平成16年3月	1年
筑波大学大学院人間総合科学研究科	講師	自 平成16年4月	
		至 平成19年2月	2年11月

・主な共同研究者(又は指導を受けた研究者)

東京慈恵会医科大柏病院・消化器肝臓内科・教授	大草敏史
国立感染症研究所・感染病理部・部長	佐多徹太郎
国立感染症研究所・寄生動物部・部長	野崎智義
国立感染症研究所・細菌第1部・部長	大西真
国立感染症研究所・細菌第2部・部長	荒川宜親
国立感染症研究所・ウイルス第1部・主任研究官	水谷哲也
国立感染症研究所・獣医科学部・室長	井上智
国立成育医療研究センター研究所・免疫アレルギー研究部・室長	阿部淳

・主な研究課題

1. ブドウ球菌属のゲノム解析
2. バイオテロ・新興感染症対策としての超高速ゲノム解読システムの構築
3. 薬剤耐性食中毒菌に係るゲノム配列レベルでの検出系開発
4. 感染症の関与が疑われる難治性疾患の病原体検索・解析

・これまでの研究実績

※本研究の成果以外の実績も記載してください。

(成果概要VIと重複するものや本研究成果によるものは、太字・斜体文字で記載してください)

※発表論文名・学協会誌名・発表年(西暦)、知的財産権の取得及び申請状況、研究課題の実施を通じた政策提言(寄与した指針又はガイドライン等)のうち、主なものを選択し、直近年度から順に記載してください。

1. 著書

(1) Makoto Kuroda, and Keiichi Hiramatsu.

Chapter "Genome sequencing and annotation: an overview" in *Genomics, Proteomics and Clinical Bacteriology*. Humana Press Inc. (2003) (筆) (ゲノム配列解読と遺伝子予測法)

(2) Hiramatsu K., Kuroda M., Baba T., K. Okuma.

Application of Genomic Information to the Diagnosis, Management and Control of Bacterial Infections: *Staphylococcus aureus* model. *Diagnostic Molecular Microbiology* 2nd Ed. D. Persing. ASM Press. (2002)

(他) (黄色ブドウ球菌をモデルにしたゲノム情報による細菌感染症の診断・マネジメント)

2. 学術論文

1) 欧文.

1. Sekizuka T, Matsui M, Yamane K, Takeuchi F, Ohnishi M, Hishinuma A, Arakawa Y, Kuroda M (2011) Complete Sequencing of the bla(NDM-1)-Positive IncA/C Plasmid from *Escherichia coli* ST38 Isolate Suggests a Possible Origin from Plant Pathogens. *PLoS one* 6: e25334.

2. Shahada F, Sekizuka T, Kuroda M, Kusumoto M, Ohishi D, Matsumoto A, Okazaki H, Tanaka K, Uchida I, Izumiya H, Watanabe H, Tamamura Y, Iwata T, Akiba M (2011) Characterization of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium isolates harboring a chromosomally encoded CMY-2 beta-lactamase gene located on a multidrug resistance genomic island. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 55: 4114-4121.

3. Tsukagoshi H, Mizuta K, Abiko C, Itagaki T, Yoshizumi M, Kobayashi M, Kuroda M, Kozawa K, Noda M, Ryo A, Kimura H (2011) The impact of Saffold cardiovirus in patients with acute respiratory infections in Yamagata, Japan. *Scandinavian journal of infectious diseases* 43: 669-671.

4. Ogawa A, Furukawa S, Fujita S, Mitobe J, Kawarai T, Narisawa N, Sekizuka T, Kuroda M, Ochiai K, Ogihara H, Kosono S, Yoneda S, Watanabe H, Morinaga Y, Uematsu H, Senpuku H (2011) Inhibition of *Streptococcus mutans* biofilm formation by *Streptococcus salivarius* FruA. *Applied and environmental microbiology* 77: 1572-1580.

5. Izumiya H, Sekizuka T, Nakaya H, Taguchi M, Oguchi A, Ichikawa N, Nishiko R, Yamazaki S, Fujita N, Watanabe H, Ohnishi M, Kuroda M (2011) Whole-genome analysis of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium T000240 reveals the acquisition of a genomic island involved in multidrug resistance via *IS1* derivatives on the chromosome. *Antimicrobial*