

HCV ワクチン用粒子作製を目的とした HCV 複製可能細胞の探索

研究分担者 加藤 孝宣 国立感染症研究所ウイルス第二部 室長
研究協力者 村山 麻子 国立感染症研究所ウイルス第二部

研究要旨：ウイルス粒子を用いた感染予防ワクチンの開発においては、ウイルス粒子作製の際にワクチン製造に適した細胞株を用いる必要がある。ワクチン製造細胞として過去に実績のある細胞株を用いて HCV 粒子産生能を解析した結果、アフリカミドルザル腎臓由来の Vero 細胞において HCV の作製が可能であった。

A. 研究目的

C 型肝炎ウイルス（HCV）は世界中に多くの感染者が存在し、日本でも 100 万人以上の感染者が存在すると考えられている。近年、輸血用血液のスクリーニングにより、輸血後の C 型慢性肝炎発症者は減少しているが、医療従事者などのハイリスク群では現在でも新規感染者が存在する。最近、HCV の複製を直接阻害する新規抗 HCV 薬が登場し、C 型慢性肝炎に対する高い治療効果が期待されている。しかしこれらの薬剤は高額なため漫然と使用されれば医療経済を圧迫しかねない。HCV 感染による肝疾患を減少させるためには新規感染者をなくすることが重要であり、感染予防ワクチンの開発が必要とされている。

2005 年に JFH-1 株を用いた HCV の感染増殖系が開発され、感染性 HCV 粒子を培養細胞で作製できるようになった。この培養細胞中で作製された HCV 粒子は、患者血清中のウイルス粒子とほぼ同様の形態であることが電子顕微鏡で確認されており、不活化することにより HCV ワクチンとして使用できる

と考えられる。しかし、現行の HuH-7 細胞を用いた感染増殖系では、HuH-7 細胞が肝癌由来の細胞であることから、この細胞で作製した HCV 粒子ワクチンは認可が難しいことが予想される。さらに、過去にワクチン製造細胞として実績のある細胞が利用できれば、ワクチンとしてより承認されやすくなることが考えられる。そこで本研究では、HuH-7 細胞以外の非癌細胞を用いたウイルス粒子産生系について検討した。

B. 研究方法

1. HCV RNA 導入による HCV 複製の検討
Vero 細胞、MRC-5 細胞、CHO 細胞、MDCK 細胞に全長 HCV RNA を導入し、経時的に培養液中と細胞内のコア抗原量を ELISA で測定した。

2. HCV 感染感受性の検討

HCVpp (pseudo particles) の感染実験は以下のように行った。それぞれの細胞を 96 well plate に 1×10^5 cells/well で播種し、翌日

に HCVpp を感染させた。4 時間後に培養液を交換し、そのまま 3 日間培養した。細胞は細胞破碎液を加えて溶解させ、溶解液中のルシフェラーゼ活性を測定した。

HCVcc (cell culture-generated virus) の感染実験は以下のように行った。それぞれの細胞を、カバーグラスを入れた 12 well plate に 1×10^5 cells/well で播種し、翌日 HCVcc を MOI (Multiplicity of Infection) = 1~3 で感染させた。感染 3 日後に細胞を固定し、抗 NS5A 抗体で HCV 陽性細胞を可視化した。

3. ヒト宿主因子の発現量の比較

miR-122 の発現量測定は、細胞から total miRNA を抽出し、逆転写して得た cDNA を用いて、Taqman microRNA Assay を行った。miR-122 の発現量は U6 snRNA を内部標準とし、その発現量の何倍かで比較した。

その他の宿主因子の発現量測定は、それぞれの宿主因子に特異的な primer、probe を用いて行った。細胞から total RNA を抽出し、逆転写して得た cDNA を用いて、Taqman Gene Expression Assay を行った。それぞれの宿主因子の発現量は 18S を内部標準とし、その発現量の何倍かで比較した。

4. 宿主因子発現レンチウイルスベクターの作製

miR-122、CD81、Occludin、Claudin-1、SR-B1、ApoE それぞれの ORF を組み込んだ pLVSIN ベクターを作製し、293T 細胞で packaging させ、1 回感染型レンチウイルスを作製した。ウイルス力価は EGFP を発現す

るウイルスを用いて flow cytometry および、qRT-PCR により決定した。

5. ヒト宿主因子を発現する Vero 細胞の作製

上記で作製したレンチウイルスをそれぞれ MOI=1~5 で polybrene 存在下において Vero 細胞、MRC-5 細胞、CHO 細胞、MDCK 細胞に単独、もしくは重複感染させた。各細胞は 2 週間培養後、各遺伝子の発現量を測定した。それぞれの細胞での miR-122 の発現量を、Taqman microRNA assay により、CD81、Occludin、Claudin-1、SR-B1、ApoE の発現量を Taqman Gene Expression Assay により測定した。

6. ヒト宿主因子を発現する Vero 細胞での HCV 複製およびウイルス産生の検討

様々なヒト宿主因子を発現する Vero 細胞に HCV の全長 RNA をトランスフェクションし、細胞内、培養上清のコア抗原量を ELISA で測定した。培養上清の感染性を調べるために、回収した培地を Amicon Ultra-15 filter units を用いて 40 倍に濃縮し、Huh-7.5.1 細胞を用いて感染性を測定した。

(倫理面への配慮)

本研究で使用するヒト由来試料はすでに樹立された細胞株であり倫理面での問題はないと考えられる。各種組換え DNA を用いた感染ウイルス生成および感染実験は、大臣確認申請を行い承認されている。

C. 研究結果

1. HuH-7細胞以外の培養細胞を用いたHCV粒子産生系の検討

ワクチン製造細胞として実績がある細胞として、MRC-5 細胞、Vero 細胞、MDCK 細胞、CHO 細胞、HuGK-14 細胞を検討した。それぞれの細胞に全長 HCV RNA を導入し、HCV のゲノム複製およびウイルス産生を検討したが、いずれの細胞でも HCV のゲノム複製、ウイルス産生は観察されなかった。

2. レンチウイルスベクターによるヒト宿主因子の強制発現の検討

HCV 複製、ウイルス産生に必要な宿主因子を細胞で効率よく高発現させるために、レンチウイルスベクターによる遺伝子導入を試みた。作製した miR-122 を発現させるレンチウイルスを用いてそれぞれの細胞に感染させたところ、いずれの細胞でも Huh-7.5.1 細胞と同程度の miR-122 の発現量が得られた。

3. miR-122 を強制発現させた細胞におけるHCV 複製の検討

miR-122 を強制発現させた Vero 細胞 (Vero/miR-122) では、HCV RNA 導入後にわずかではあるが時間経過とともに細胞内コア抗原量の上昇が認められた。HCV RNA 導入細胞を抗 NS5A 抗体で免疫染色すると、割合は非常に少ないが HCV 陽性細胞が観察された。しかし、その他の細胞では、miR-122 を強制発現させても、HCV 複製は認められなかった。そこで、以降は Vero 細胞のみに

ついて検討を行った。

5. miR-122 を高発現する Vero 細胞のクローニングと HCV 複製能の検討

Vero/miR-122 細胞集団をクローニングし、それぞれの細胞株の miR-122 の発現量を測定したところ、発現量は細胞株によって異なることが判明した。そこで、miR-122 の発現量が高い細胞株として clone#6 を選択し、HCV RNA を導入した結果、時間経過とともに細胞内のコア抗原量の増加が見られた。HCV RNA 導入 3 日後の細胞内コア抗原量は Huh-7.5.1 細胞に匹敵する高値であった。HCV RNA 導入細胞を抗 NS5A 抗体で免疫染色すると、クローニングする前の細胞集団より HCV 陽性細胞の割合が増加していた。

4. Vero 細胞での HCV 受容体の発現レベルの検討

Vero 細胞に miR-122 を発現させると HCV RNA 導入後の HCV 複製が可能であるにも関わらず、ウイルス感染は観察されなかった。そこで、Vero 細胞に HCV 受容体が発現しているかを調べた。Vero 細胞の CD81、Occludin、Claudin-1、SR-B1 の mRNA の発現量を Huh-7.5.1 細胞と比較した結果、CD81 はどちらの細胞も同レベルの発現量であり、Occludin の発現量は Vero 細胞の方が高かったのに対して、Claudin-1、SR-B1 の発現量は Vero 細胞の方が低いことが判明した。それぞれの抗体を用いて細胞表面の発現量を FACS で検出した結果も同様であった。さらに、Vero 細胞に発現している CD81、

Occludin の配列を調べた結果、HCV 感染に重要な領域である CD81 LEL、Occludin EL2 において、ヒト配列と比較してそれぞれ 4 個、1 個のアミノ酸が異なっていた。

5. 4 つのヒト HCV 受容体を発現する細胞の作製および HCV 感染感受性の検討

Vero 細胞では Huh-7.5.1 細胞と比較して Claudin-1、SR-B1 は発現量が低く、CD81、Occludin は重要な領域に変異があることから、Vero 細胞に HCV 感染感受性をもたせるために、Vero/miR-122 細胞に 4 種類の HCV 受容体を同時にレンチウイルスベクターで発現させた Vero/miR-122+4R 細胞を作製した。

この細胞に HCVpp を感染させると、細胞内のルシフェラーゼ活性は Vero 細胞より高くなることから、HCVpp は Vero/miR-122+4R 細胞に感染できることが示された。さらに、HCVcc 感染後には HCV 陽性細胞が見られたことから、Vero/miR-122+4R 細胞には HCVcc も感染できるようになったことが示された。

6. Vero 細胞の HCV 感染感受性に必要なヒト HCV 受容体の同定

4 つの受容体を同時に発現させると Vero 細胞が HCV 感染感受性を示したことから、その中でどの受容体が重要なのかを調べた。Vero/miR-122 細胞 (clone#6) にそれぞれ 1 種類の受容体のレンチウイルスベクターを感染させ、それぞれの受容体を発現する細胞を作製した。その細胞に HCVcc を感染させると、SR-B1 をコードするレンチウイルスベ

クターを感染させた Vero/miR-122/SR-B1 細胞が HCVcc 感染感受性を示した。

7. Vero 細胞での感染性ウイルス産生の検討

Vero/miR-122 細胞では HCV RNA 導入後に細胞内で HCV コア抗原は効率よく増えるものの、感染性ウイルスの産生は見られなかった。そこで、感染性ウイルス産生に重要な宿主因子の一つである、ApoE の発現量を調べた。Vero 細胞では Huh-7.5.1 細胞より発現量は高かったものの、遺伝子配列をシーケンスした結果、多数のアミノ酸変異があり、また中央部が欠失したものも見られたことから、Vero 細胞では ApoE が正常に機能していない可能性が考えられた。そこで、レンチウイルスベクターを用いて ApoE を発現させた細胞 (Vero/miR-122/4R/ApoE) を作製した。Vero/miR-122/4R/ApoE 細胞に HCV RNA を導入し、3 日後の培養上清を naïve な Huh-7.5.1 細胞に添加し、培養すると、HCV 陽性細胞が検出されたことから、Vero/miR-122/4R/ApoE 細胞は HCV RNA 導入により感染性 HCV を産生できることが示された。

8. HCV ライフサイクル全体が再現可能な Vero 細胞株の樹立

複製に重要な miR-122、感染に重要なヒト SR-B1、感染性粒子産生に重要なヒト ApoE を発現する Vero 細胞株 clone#11-7 を樹立した。この細胞に HCVcc を添加すると、HCV 陽性細胞が観察され、HCV 感染が確認された。HCV RNA 導入後には、細胞内コア抗原

量の増加が認められ、HCV 複製も可能であった。培養 3 日目の培養上清には感染性も認められた。以上の結果から、Vero clone#11-7 は HCV 感染から感染性ウイルス産生までの HCV ライフサイクル全体が再現できる細胞であった。

D. 考察

HuH-7 細胞以外の培養細胞を用いてワクチン用粒子産生系を樹立する目的で様々な細胞を用いて検討を行ったが、ワクチン製造の実績のある細胞のなかには、そのままでは HCV が複製できるものはなかった。miR-122 を発現させた場合に HCV 複製が見られたのはその中でも Vero 細胞のみであったことから、miR-122 を高発現させることにより、どんな細胞でも HCV が複製可能になる訳ではないと考えられる。miR-122 以外にも HuH-7 での HCV 複製を規定する因子があるのかもしれない。

HCV 感染過程については、Vero 細胞に SR-B1 を発現させた場合に HCV の感染が観察されたが、高 MOI で感染させても感染細胞の割合はそれほど多くなかった。SR-B1 以外にも Vero 細胞で機能していない、もしくは発現の低い因子がある可能性が考えられ、それらの因子を発現させることにより、Vero 細胞の感染感受性をさらに上昇させることができると考えている。

感染性ウイルス産生過程については、ヒト ApoE を発現させることにより、Vero 細胞でも感染性ウイルスを産生させることが可能であることが明らかとなった。感染性ウイ

ルス産生に重要な宿主因子は他にもいくつか報告があり、それらのほとんどは Vero 細胞では発現が低いことからそれらの因子の寄与についても検討していきたい。

さらに、Vero 細胞ではインターフェロン $\alpha\beta$ 遺伝子は欠失していることが報告されているが、HCV RNA の導入によって ISG の誘導がみられることから、自然免疫系を阻害することによりさらに HCV 複製が増強する可能性が考えられる。

また、Vero 細胞を用いたさらに効率の良い HCV 感染増殖系樹立のために、肝臓由来の cDNA ライブラリーを用いて Vero 細胞で HCV 粒子を産生させるために必要な宿主因子の網羅的解析および同定を試みる予定である。

E. 結論

非がん細胞であり、様々なワクチン製造に使用されている Vero 細胞では miR-122 を発現させると HCV 複製が可能となり、さらに SR-B1 と ApoE の発現により、HCV 感染とウイルス産生がみられた。このように HCV ライフサイクルに必要な因子を同定し、発現させることにより、ヒト由来でなく、さらに肝細胞由来でもない非癌細胞の Vero 細胞でも HCV ライフサイクル全体が再現できた。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Sugiyama N, Murayama A, Suzuki R,

Watanabe N, Shiina M, Liang TJ, Wakita T, Kato T. Single strain isolation method for cell culture- adapted HCV by end-point dilution and infection. PLoS One, 9(5), e98168, 2014.

2) Yamada N, Shigefuku R, Sugiyama R, Kobayashi M, Ikeda H, Takahashi H, Okuse C, Suzuki M, Itoh F, Yotsuyanagi H, Yasuda K, Moriya K, Koike K, Wakita T, Kato T. Acute hepatitis B of genotype H resulting in persistent infection. World J Gastroenterol, 20(11), 3044-9, 2014.

3) Kondo Y, Ninomiya M, Kimura O, Machida K, Funayama R, Nagashima T, Kobayashi K, Kakazu E, Kato T, Nakayama K, Lai MM, Shimosegawa T. HCV infection enhances Th17 commitment, which could affect the pathogenesis of autoimmune diseases. PloS One, 9(6), e98521, 2014.

4) Sung PS, Murayama A, Kang W, Kim MS, Yoon SK, Fukasawa M, Kondoh M, Kim JS, Kim H, Kato T, Shin EC. Hepatitis C virus entry is impaired by claudin-1 downregulation in diacylglycerol acyltransferase-1-deficient cells. J Virol, 88(16), 9233-9244, 2014.

5) Masaki T, Matsunaga S, Takahashi H, Nakashima K, Kimura Y, Ito M, Matsuda M, Murayama A, Kato T, Hirano H, Endo Y,

Lemon SM, Wakita T, Sawasaki T, Suzuki T. Involvement of hepatitis C virus NS5A hyperphosphorylation mediated by casein kinase I-alpha in infectious virus production. J Virol, 88(13), 7541-7555, 2014.

6) Shiota T, Li TC, Yoshizaki S, Kato T, Wakita T, Ishii K. Establishment of Hepatitis E Virus Infection-Permissive and -Nonpermissive Human Hepatoma, PLC/PRF/5, Subclones. Microbiol Immunol. 2014 Dec 10. doi: 10.1111/1348-0421.12219.

2. 学会発表

1) Murayama A, Sugiyama N, Wakita T, Kato T. Hepatitis C virus replication in a monkey kidney-derived cell line. 21th International Symposium on Hepatitis C and Related Viruses, September 7-11, 2014. Banff, Canada.

2) Kato T, Sugiyama N, Murayama A, T Matsumura, M Shiina, S Asabe, Wakita T, M Imawari. Antimicrobial Peptide LL-37 Deteriorate Infectivity of Hepatitis C Virus. 21th International Symposium on Hepatitis C and Related Viruses, September 7-11, 2014. Banff, Canada.

3) Sugiyama R, Sugiyama N, Murayama A, Tasaka-Fujita M, Masaki T, Wakita T, Kato T. Elucidation of effects on HCV

propagation and ISG induction by amino acid substitution in interferon sensitivity-determining region. 21th International Symposium on Hepatitis C and Related Viruses, September 7-11, 2014. Banff, Canada.

4) Yokokawa H, Nakamura N, Higashino A, Suzuki S, Akari H, Kato T, Ishii K, Wakita T. Inactivated Hepatitis C Virus Particle Vaccine Induces Anti-HCV Antibodies in Common Marmosets. 21th International Symposium on Hepatitis C and Related Viruses, September 7-11, 2014. Banff, Canada.

5) Saga R, Fujimoto A, Watanabe N, Matsuda M, Hasegawa M, Watashi K, Aizaki H, Nakamura N, Konishi E, Kato T, Takeyama H, Wakita T, Suzuki R. Japanese Encephalitis Virus-subviral Particles Harboring HCV Neutralization Epitopes Induce Neutralizing Antibodies Against HCV. 21th International Symposium on Hepatitis C and Related Viruses, September 7-11, 2014. Banff, Canada.

6) Murayama A, Sugiyama N, Wakita T, Kato T. Infection and Replication of Hepatitis C Virus in Vero cells Derived from Green Monkey Kidney. 65th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases, November 7-11, 2014. Boston, USA.

7) 杉山隆一、杉山奈央、村山麻子、藤田めぐみ、山田典栄、脇田隆字、加藤孝宣. NS5A-ISDR アミノ酸変異が HCV 増殖に与える影響の解析. 第 24 回抗ウイルス療法研究会総会、2014 年 5 月.

8) 村山麻子、藤原圭、脇田隆字、加藤孝宣. C 型肝炎ウイルスの細胞培養系を用いた第二世代 NS5A 阻害剤の抗ウイルス活性の評価. 第 50 回日本肝臓学会総会、2014 年 5 月 29-30 日、東京.

9) 杉山隆一、杉山奈央、村山麻子、藤田めぐみ、山田典栄、新田沙由梨、脇田隆字、加藤孝宣. NS5A-ISDR アミノ酸変異による HCV 増殖および IFN 感受性への影響. 第 62 回日本ウイルス学会学術集会、2014 年 11 月 10-12 日、横浜.

10) 村山麻子、杉山奈央、脇田隆字、加藤孝宣. C 型肝炎ウイルスが感染複製可能なベロ細胞株の樹立. 第 37 回日本分子生物学会年会. 2014 年 11 月 25-27 日、横浜.

G.知的所有権の出願・登録状況
なし

感染中和抗体と感染中和機構の解析

研究分担者 脇田 隆字 国立感染症研究所ウイルス第二部 部長
研究協力者 渡邊 則幸 国立感染症研究所ウイルス第二部 協力研究員

研究要旨 精製した欠失型 E2 タンパク質をマウスに免疫して抗体誘導についての解析を行い E2 抗体の誘導を確認した。マウス抗血清による感染阻害効果を確認したが、阻害効果は主に Linear エピトープに対する E2 抗体によるものであった。また、HCV エンベロープペプチドを用いた感染阻害実験から E1 タンパク質領域に感染に重要な 30 アミノ酸を新たに同定した。

A. 研究目的

HCVエンベロープであるE1、E2タンパク質はウイルスの侵入に重要な機能を担うことが数多く報告されていることから、HCV感染の予防や治療のためのワクチン候補として期待されている。特にE2タンパク質については、結晶化構造解析や慢性感染患者の免疫細胞から樹立されたE2抗体の研究から感染中和に重要な領域が明らかになった。本研究では感染中和に重要なE2抗体を誘導するために最適なE2タンパク質の構造を明らかにすることを目的として、欠失型の精製E2タンパク質を用いてマウスに免疫操作を行い誘導されたE2抗体の感染中和効果について解析した。また、E2タンパク質ほど解析の進んでいないE1タンパク質の新たな機能を明らかにするために合成ペプチドを用いてE1タンパク質の機能についても解析を進めた。

（倫理面への配慮）

各種研究材料の取り扱い及び組換え DNA 実験は、適切な申請を行い承認を受ける。ま

た、本研究で使用するヒト由来試料はすでに樹立された細胞株であり倫理面での問題はないと考えられるが、新たにヒト組織などを使用する必然性が生じた場合には、文部科学省等でまとめられた「ヒトゲノム、遺伝子解析研究に関する倫理指針」及び、平成 13 年 3 月 29 日付 12 文科振第 266 号文部科学省研究振興局長通知に則り、当該研究機関の医学研究倫理審査委員会に申請し、インフォームドコンセントに係る手続きを実施し、提供試料、個人情報厳格に管理保存する。

B. 研究方法

（1）E2 タンパク質作製とマウスへの免疫操作

N 末端に分泌シグナルと flag 配列を付加した野生型の E2(384-714)と 3 種の欠失型 E2(411-714)、E2(411-650)、E2(421-714)を発現するプラスミドを 293T 細胞に遺伝子導入して E2 タンパク質を作製した。培養上清から E2 タンパク質を M2 アガロースカラムで精製、脱塩カラムで PBS に置換して濃縮した。

免疫操作については、1 グループ 5 匹のマウスに 10 mg の精製タンパク質を adjuvant (Alum 及び CpG) と混合して、2 週間おきに 4 回腹腔内投与し毎回投与 1 週間後に採血した。

(2) E2 抗体価の測定

精製 E2 タンパク質をコートした 96 ウェルプレート (50 ng/ウェル) を BlockAce でブロッキング後、PBS-T (PBS, 0.05% Tween20) で 5000 倍希釈したマウス血清を室温で 1 時間反応させた。PBS-T で洗浄後、PBS-T で 5000 倍希釈したマウス IgG-HRP 抗体を室温で 1 時間反応させた。PBS-T で洗浄後に HRP 発色キットで発色させてプレートリーダーで測定した。

(3) ペプチド、E1 抗体、抗 E2 血清を用いた HCV 感染阻害実験

HuH7.5.1 細胞 (1×10^4 個) に 50 ffu の JFH-1 を感染させた。この時、ペプチド (5-25 mM)、E1 抗体 (1-50 mg/ml)、E2 血清 (100 倍希釈) を添加した。感染 72 時間後に細胞をエタノール固定、抗 HCV コア抗体と蛍光二次抗体で染色して陽性細胞数を計測した。

C. 研究結果

(1) E2 タンパク質による感染中和抗体誘導

E2 タンパク質をターゲットとする効率的な中和抗体誘導を目的とし、N 末端および C 末端を欠失した E2 タンパク質を作製、マウスに免疫することで中和抗体誘導効果を調べた。欠失 E2 タンパク質は HVR 領域を欠失した E2(411-714)、E2 コア構造の

E2(411-650)、感染中和に重要な Linear エピトープを欠失した E2(421-714)で、野生型 E2(384-714)とこれら 3 種の欠失 E2 タンパク質を用いてマウスに免疫した。その結果、すべての E2 タンパク質について、免疫後の 1 週から 7 週にかけて血中の E2 抗体価が上昇した。7 週後の血清を用いて感染阻害実験を行ったところ、E2(384-714)、E2(411-650)、E2(411-650)の抗 E2 血清では感染中和が観察されたが E2(421-714)では阻害効果が低下した。

(2) E1 タンパク質の機能解析

HCV エンベロープの全長をカバーする 20 アミノ酸の合成ペプチド (51 種類) の存在下で HCV 感染阻害実験を行った。その結果、2 種のペプチド E1(282-301)、E1(292-311)について感染阻害が観察された。阻害は濃度依存的であり、重複する領域の 10 アミノ酸の短いペプチド E1(292-301)でも感染阻害が観察された。また、2 種類をカバーする 30 アミノ酸のペプチド E1(282-311)についても同様の効果があり、異なる遺伝子型の構造領域を有するキメラウイルス (TH 株、S310 株) を用いた感染阻害実験では 20 アミノ酸のペプチドよりも効果的に阻害した。ペプチドによる阻害のステップを調べるために、30 アミノ酸のペプチドを細胞に 2 時間前処理して洗浄後に感染実験を行った。ペプチドは前処理だけでもウイルス感染を阻害した。また、30 アミノ酸の領域に対する抗体を作成した。親水性が高いと予想される E1(293-304)と全長の E1(282-311)についてウサギに免疫し抗 E1 血清を得た。それぞれの抗 E1 血清の反応

性について組換え E1 タンパク質を用いてウエスタンブロットで確認したところ、バンドのパターンが異なっていた。抗 E1 血清を用いた感染阻害実験では感染阻害は観察されなかったが、精製 IgG 存在下での感染阻害実験では 12 アミノ酸に対する E1 抗体について感染阻害が観察された。

D. 考察

(1) E2 タンパク質による感染中和抗体誘導について

近年、E2 タンパク質と E2 抗体の共結晶化の研究から E2 コア領域の結晶構造が明らかになり、ウイルス感染を阻害する E2 抗体の認識領域が明らかになった。感染中和に重要なエピトープについてはエピトープマッピング実験から 411-423 番アミノ酸の linear エピトープが、アミノ酸変異実験からは複数個所のアミノ酸領域で構成された conformational エピトープの 2 か所の領域が知られている。結晶構造と照らし合わせると Linear エピトープについては結晶化できていないことから柔軟な構造と予想される。conformational エピトープについては、異なる遺伝子型のウイルスに中和効果を示す抗体の結合する構造領域と遺伝子型特異的に中和効果を示す構造領域に分けられた。本研究では、これらの感染中和抗体を効果的に誘導するためにはどのような構造の E2 タンパク質が有用なのかを知るために、欠失型の E2 タンパク質による抗体誘導について解析した。すべての欠失型 E2 タンパク質について E2 抗体の誘導を同程度に確認したが、抗

E2 血清による感染阻害効果については E2 (421-714) において阻害効果が低下していた。これは E2 タンパク質を免疫することで誘導される中和抗体は主に Linear エピトープに対する抗体であることを示唆する結果である。この領域は感染中和を回避する変異ウイルスが出現することから、conformational エピトープ抗体の誘導がより重要であると考えられる。

(2) E1 タンパク質の機能解析について
E1 タンパク質の機能については E2 タンパク質ほど進んでおらず本研究において新たにウイルス感染に重要な領域 (282-311) を明らかにした。E1 ペプチドの前処理で感染阻害が観察されたことからこの領域に結合する宿主因子の存在が考えられる。30 アミノ酸の二次構造予測によると 294 番辺りからヘアピン構造を形成して折り返しベータシート構造を形成するようであった。この構造が宿主因子に結合することでウイルス侵入が起こり、30 アミノ酸のペプチドはその構造と競合して感染をブロックすると予想できる。また、この領域に対する E1 抗体はウイルス感染を阻害することからも、282 から 311 番アミノ酸はウイルス侵入に重要な役割を担うと考えられる。E1 タンパク質の機能解析を進めることでウイルスの侵入機構を明らかにしたい。

E. 結論

1. 欠失型リコンビナント E2 蛋白質による感染中和抗体誘導能を検討した。
2. E1 ペプチドによる感染阻害活性を同定した。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Shirasago Y, Sekizuka T, Saito K, Suzuki T, Wakita T, Hanada K, Kuroda M, Abe R, Fukasawa M. Isolation and Characterization of A Huh.7.5.1-Derived Cell Clone Highly Permissive to Hepatitis C Virus. Jpn J Infect Dis. 2014 Nov 25. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 25420655.
- 2) Kim S, Date T, Yokokawa H, Kono T, Aizaki H, Maurel P, Gondeau C, Wakita T. Development of hepatitis C virus genotype 3a cell culture system. Hepatology. 2014 Dec;60(6):1838-50.
- 3) Daito T, Watashi K, Sluder A, Ohashi H, Nakajima S, Borroto-Esoda K, Fujita T, Wakita T. Cyclophilin Inhibitors Reduce Phosphorylation of RNA-dependent Protein Kinase to Restore Expression of IFN-stimulated Genes in HCV-infected Cells. Gastroenterology. 2014 Aug;147(2):463-72.
- 4) Shiokawa M, Fukuhara T, Ono C, Yamamoto S, Okamoto T, Watanabe N, Wakita T, Matsuura Y. Novel permissive cell lines for complete propagation of hepatitis C virus. J Virol. 2014 May;88(10):5578-94.

2. 学会発表および講演など

- 1) Wakita T. Cell culture models of hepatitis C virus. 21st International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Banff (Canada), Sep, 2014
- 2) Watanabe N, Date T, Kono T, Aizaki H, Wakita T. Identification of an important envelope region by competitive inhibition experiment with envelope peptides. 21st International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Banff (Canada), Sep, 2014
- 3) Wakita T, Kong L, Aizaki H. Regulation of viral lifecycle in hepatitis C virus infection. Dynamic interplay between viruses and their hosts, Yokohama, Nov, 2014
- 4) 渡邊則幸、伊達朋子、河野環、溝上雅史、相崎英樹、脇田隆字。E1 ペプチドによる HCV 感染阻害機構の解析。第 62 回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014 年 11 月
- 5) 横川寛、中村紀子、東濃篤徳、鈴木紗織、明里宏文、加藤孝宣、石井孝司、脇田隆字。培養細胞由来 HCV 粒子のマーマーセットにおける抗 HCV 抗体誘導能の検討。第 62 回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014 年 11 月

G. 知的所有権の出願・登録状況
なし

HCV 予防・治療ワクチンの霊長類モデルによる評価系の確立

研究分担者 明里 宏文 京都大学霊長類研究所人類進化モデル研究センター 教授
研究協力者 東濃 篤徳 京都大学霊長類研究所人類進化モデル研究センター
鈴木 紗織 京都大学霊長類研究所人類進化モデル研究センター
森 健一 先端生命科学研究所

研究要旨：C型肝炎ウイルスワクチンの実用化には、モデル動物を用いた安全性・有効性の評価が必要不可欠である。今年度までに、本研究班で開発した HCV ワクチンを実験用霊長類へ接種し、その有効性について評価を行った。その結果、当該ワクチンは中和抗体および細胞性免疫応答の両者を誘導可能であることが明らかとなり、HCV 予防のみならず治療用ワクチンとしての可能性を示す貴重な成果を得た。更に、ワクチン免疫による感染防御効果を実証する目的で、前臨床試験用モデル動物として有望なキメラウイルス感染マウスセットを新たに開発した。今後より優れた評価モデルに向けて重要な役割を担うものと期待される。さらに、キメラウイルスの持続感染能獲得に必要な免疫回避機構に関する基盤研究を推進した。以上、HCV ワクチンの臨床応用に向けた基盤研究が大きく進展した。

A. 研究目的

C型肝炎の原因ウイルスである Hepatitis C virus (HCV) は非 A、非 B 型肝炎ウイルスとしてヒト骨髄から 20 年以上前に単離された (Choo et al., Science, 1989, 24, 359-362). 現在 HCV は世界的に蔓延しており、1 億 7 千万（世界人口の 3% 近く）がキャリアと見られている。日本での持続感染者は 190 万人～230 万人存在すると推定されているが、自覚症状がないことが多く、肝硬変や肝癌へ移行する感染者が多く存在することが問題となっている。近年、有効な抗ウイルス剤が臨床応用されるようになり、HCV 制御に新たな道が拓かれた。しかし、アジア・アフリカなどの開発途上国では依然として検査体制の不備等により HCV 感染が充分コントロー

ル出来ておらず、また経済・医療事情などを鑑みると、ワクチンの開発が急務である。

近年、脇田らの JFH-1 株の発見により HCV の培養が可能となった (Wakita et al., Nature Medicine, 2005). 本研究班では、この技術を応用し大量精製した HCV 粒子を不活化することで HCV 予防・治療ワクチンとしての実用化を目指している。ワクチン開発に当たっては、まずその適切な評価により安全性および有効性が認められることが不可欠であり、その結果を踏まえて臨床試験へと駒を進めることが可能となる。こうしたワクチンの臨床応用を目指した橋渡し研究においては、接種ワクチン抗原やアジュバントに対する液性・細胞性免疫反応や副反応等複雑な生体応答について、適切なモデル動物を用

いた十分な評価が求められる。そこで本研究では、ヒトに近縁な霊長類モデルを用いた HCV ワクチンの安全性及び免疫誘導能を検証してきた。これまでの結果より、当該ワクチンはマーモセットへの複数回接種により有意な副反応が認められず、また中和抗体および細胞性免疫応答の両者を誘導可能であることが確認されている。今年度は、それらの免疫応答をさらに増強させることを目的に、石井ら（医薬基盤研究所）が開発した新たなアジュバントである TLR9 リガンド合成核酸 CpG ODN (K3) およびそのヒトへの親和性を高めた β グルカン複合体である K3-SPG を用いて、ワクチン接種における安全性、有効性を比較検証した。

ところで、こうしたワクチンの評価に際し、その HCV 感染防御効果を実証するためには HCV 感染動物モデルが求められる。免疫機能が正常でかつ HCV が感染する実験動物は、現状ではチンパンジーのみであり、過去の研究ではチンパンジー-HCV 感染モデルにより多くの貴重な知見が得られている。しかしチンパンジーが絶滅危惧種であること、ヒトに極めて近縁な霊長類であり倫理的問題が存在することなどから、今日ではチンパンジーの感染実験への使用は我が国を始め諸外国でもほぼ全面的に禁止されているのが実情である。これらのことがワクチンの開発に不可欠な個体レベルでの安全性・有効性評価、さらに C 型肝炎の病態解析を行なうにあたって大きな障壁となっている。この問題を克服する方法の 1 つとして GBV-B/HCV キメラウイルスによるサル感染モデルの応用が

挙げられる。GBV-B はタマリンから単離され、HCV と同じくヘパチウイルス属として分類されており、新世界ザルに感染性を示し、急性および慢性 C 型肝炎様病態を引き起こす。そこで、GBV-B ゲノムの一部を HCV ゲノムと組換えることにより、サル類で複製増殖可能なキメラウイルスが出来れば、HCV 感染防御効果を実証することが可能となる。昨年度は HCV/GBV-B キメラウイルス GB/HC uCE12 (HCV の 5' UTR 一部、core, E1, E2 領域を有する) 及び GB/HCE12 (HCV の E1, E2 領域を有する) のサル個体での増殖能を検討したところ、感染 8 週までの時点で血漿中からウイルス RNA が断続的に検出された。今年度は引き続きそのフォローアップ解析を行った。さらに、上記キメラウイルスのフレームワークが GBV-B ベースであることを踏まえ、GBV-B 感染個体における病態進行の個体差を引き起こす機序について、ウイルスゲノム変異の視点から解析した。

B. 研究方法

- ・ワクチン接種：マーモセット 6 頭を 3 群、各 2 頭に分け、それぞれ不活化 HCV 粒子 (60 pmol の HCV コアタンパク質に相当) にアジュバント Alum (250 μ g/head: Imject Alum; Thermo SCIENTIFIC 社)、Alum+K3 (250 μ g + 30 μ g/head) もしくは K3-SPG (90 μ g/head) を混和したものを筋注および皮下接種した。
- ・細胞性免疫応答の解析：ワクチン接種マーモセットの血液より PBMC を分離し、凍結保

存した。凍結 PBMC は 37℃で融解後 RPMI 培地 (10%FCS、1%ペニシリンストレプトマイシン) にて 1 時間前培養を行い、HCV 抗原 (core-JFH; genotype 2a もしくは core-1; genotype 1a+1b consensus, 1 μ g/ml) または Concanavalin A (5 μ g/ml) を添加して 6 時間培養した。培養後は細胞を回収し RNA 抽出・cDNA 合成を行い、リアルタイム PCR を行った。リアルタイム PCR では GAPDH と IFN- γ mRNA 発現量を測定し、 Δ CT 法にて解析後無刺激サンプルとの相対値で各サンプルとの誤差を標準化し、さらに 0 週との比でグラフに示した。

・キメラウイルス接種実験：キメラウイルスクローン (GB/Hc uCE12, GB/HCE12) RNA をマーモセットに麻酔下で肝臓に直接接種した。その後、経時的に採血しウイルス複製増殖能を評価した。

(倫理面の配慮)

すべての動物実験は、倫理面を含めて京都大学動物実験委員会の審査・承認を得て実施した。組み換え DNA 実験については学内安全委員会および文部科学大臣による確認を得て実施した。

C. 研究結果

(1) HCV ワクチンの評価に関する研究

・マーモセットにおける K3-SPG 評価：K3-SPG についてはマーモセットにおけるアジュバント効果およびその安全域に関する知見がなかったため、まずそれらの評価を行う必要があった。そこでカニクイザルを用い

た先行論文を踏まえ、不活化 HEV-VLP を抗原として K3-SPG 10 μ g, 30 μ g, 90 μ g を添加したものを免疫し比較検討を行った。その結果、K3-SPG 90 μ g で最も良好な抗体応答が認められた。またいずれの条件でも有意な副反応は認められなかった。そこで不活化 HCV ワクチンのアジュバントとして K3-SPG を 90 μ g で使用することとした。

・ワクチン接種および安全性評価：マーモセット 6 頭を 3 群、各 2 頭に分け、それぞれ不活化 HCV 粒子にアジュバント Alum、Alum+K3 もしくは K3-SPG を混和したものを 2 回、4 週間隔で接種した。臨床獣医学的、血液学的検査により、いずれのマーモセットにおいてもワクチン接種開始後 8 週まで異常な炎症応答や肝・腎毒性は見られなかったことから、今回用いた免疫プロトコルにおける安全性が示された。

ワクチン接種による免疫誘導能の検討：まず抗体応答に関しては、K3-SPG 群において Alum、Alum+K3 群と比較して数倍程度高い抗 HCV-E2 抗体価および中和抗体価が確認された (詳細は鈴木らの報告を参照のこと)。次に、本ワクチンによる細胞性免疫誘導能について検討を行った。ワクチン接種マーモセット PBMC に、ワクチンと同じ JFH 株 (genotype 2a) 由来 Core 蛋白を添加し刺激したところ、Alum+K3 群および K3-SPG 群の各 1 頭で明らかな IFN γ mRNA の発現誘導が認められた。また K3-SPG 群のケースでは genotype 1 由来 Core 蛋白にも高い発現が認められた。興味深いことに、K3-SPG 群では 2 頭とも高い抗体価が見られたが細胞

性免疫応答が強く誘導された個体では抗体応答はやや弱い傾向にあった。他方、Alum+K3 群では抗体応答もしくは細胞性免疫応答のどちらかが誘導されていたが、いずれも K3-SPG 群と比較すると低いものであった。

(2) HCV/GBV-B キメラウイルスに関する研究

HCV/GBV-B キメラウイルス GB/HCUCE12 (HCV の 5' UTR 一部、core, E1, E2 領域を有する) 及び GB/HCE12 (HCV の core, E1, E2 領域を有する) から *in vitro* transcription により得た RNA を同時に 3 頭のサル個体肝臓に接種し、その増殖能を検討した。感染 8 週までの時点では血漿中からウイルス RNA が断続的に検出されたが、その後 1 頭において接種後 25 週で 1 回検出されたのみであり、それ以降は全ての個体でウイルス RNA は検出されなかった。従って、HCV 由来 Core 領域の有無に関わらず、HCV E1/E2 領域への置換では良好なウイルス複製が維持できずクリアランスされたものと考えられた。

D. 考察

今年度までの研究により、マーマセツへの HCV ワクチン接種により特異抗体および IFN γ 発現上昇により示される特異的細胞性免疫が誘導されることが確認された。特筆すべきこととして、TLR9 リガンド合成核酸 CpG ODN (K3) のヒトへの親和性を高めた β グルカン複合体である K3-SPG は、既存の

アジュバントである Alum および Alum + K3 と比較して高いアジュバント効果を示したことが挙げられる。すなわち K3-SPG 群では 2 頭とも高い抗 E2 抗体価および中和抗体価が見られ、また抗体応答がやや弱い傾向にあった個体では細胞性免疫応答が強く誘導されていた。以上のことより、K3-SPG をアジュバントとして使用することで HCV ワクチン接種により中和抗体および細胞性免疫応答の両者が効率良く誘導されることが示唆された。現在、K3-SPG アジュバント混和 HCV ワクチンによる上述の結果について、更に 6 頭のマーマセツを用いた免疫誘導能に関する再現性や安全性の検証実験を行っているところである。これにより良好な結果が得られれば、臨床応用に向けたさらなる進展が望まれるところである。

ワクチン抗原およびアジュバントの最適化と平行して、ワクチン免疫による感染防御効果の実証が臨床応用に向けた重要なポイントとなるだろう。この点において、今回示したマーマセツ感染キメラウイルスが良好な増殖能を示すことが、ワクチンの有効性評価のための前臨床試験用モデルとして求められる。しかし、今回の結果では残念ながら今回用いたキメラウイルスクローンは一過性の複製増殖後クリアランスされたことから、さらなるマーマセツへの馴化、最適化が不可欠である。現在、(1) キメラウイルス遺伝子における GBV-B 由来 p13 領域を HCV 由来 p7 領域のものへ置換、(2) キメラウイルスのポリプロテインにおける NS2, NS3-4A による cleavage site 配列の精査、な

どについて検討を行っているところである。

E. 結論

本研究班で開発した HCV ワクチンを新規合成核酸- β グルカン複合体アジュバントである K3-SPG と併用することにより、特異抗体および細胞性免疫が誘導されることが確認された。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Naruse TK, Akari H, Matano T, Kimura A: Divergence and diversity of ULBP2 genes in rhesus and cynomolgus macaques. *Immunogenetics* 66, 161-170, 2014.

2) Shimoda H, Saito A, Noguchi K, Terada Y, Kuwata R, Akari H, Takasaki T, Maeda K: Seroprevalence of Japanese encephalitis virus infection in captive Japanese macaques (*Macaca fuscata*). *Primates* 55, 441-445, 2014.

3) Fujie Y, Fusaki N, Katayama T, Hamasaki M, Soejima Y, Soga M, Ban H, Hasegawa M, Yamashita S, Kimura S, Suzuki S, Matsuzawa T, Akari H, Era T: New type of Sendai virus vector provides transgene-free iPS cells derived from chimpanzee blood. *PLoS ONE* 9, e113052, 2014.

4) Ma G, Yasunaga J-i, Akari H, Matsuoka M: TCF1 and LEF1 act as T-cell intrinsic

HTLV-1 antagonists by targeting Tax. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, in press.

5) Okamoto M, Miyazawa T, Morikawa S, Ono F, Nakamura S, Sato E, Yoshida T, Yoshikawa R, Sakai K, Mizutani T, Nagata N, Takano J, Okabayashi S, Hamano M, Fujimoto K, Nakaya T, Iida T, Horii T, Miyabe-Nishiwaki T, Watanabe A, Kaneko A, Saito A, Matsui A, Hayakawa T, Suzuki J, Akari H, Matsuzawa T, Hirai H: Emergence of infectious malignant thrombocytopenia in Japanese macaques (*Macaca fuscata*) by SRV-4 after transmission to a novel host. *Scientific Reports*, in press.

2. 学会発表

1) 鈴木紗織、東濃篤徳、森健一、片貝祐子、齊藤暁、槇昇、明里宏文：GBV-B 感染マーマセット/タマリンにおける慢性化移行には液性免疫応答の遅延が関与する、第 61 回日本実験動物学会総会、札幌、2014 年 5 月 17 日

2) 東濃篤徳、鈴木紗織、齊藤暁、松岡和弘、大出裕高、片貝祐子、岡林佐知、森健一、槇昇、明里宏文：小型霊長類モデルを用いたヘパチウイルスの持続感染における慢性肝炎発症に影響するウイルスゲノム変異解析、第 61 回日本実験動物学会総会、札幌、2014 年 5 月 17 日

3) 東濃篤徳、鈴木紗織、森健一、大出裕高、松岡和弘、片貝祐子、岡林佐知、槇昇、岩谷靖雅、杉浦互、明里宏文：小型霊長類において持続感染した GBV-B の変異解析、第 62 回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014 年 11 月 10 日

4) 芳田剛、齊藤暁、松岡和弘、大出裕高、岩谷靖雅、杉浦互、保富康宏、俣野哲朗、三浦智行、明里宏文：サル個体におけるサル指向性 HIV-1 の増殖効率を上昇させる要因、第 62 回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014 年 11 月 11 日

5) 芳田剛、齊藤暁、松岡和弘、大出裕高、岩谷靖雅、保富康宏、俣野哲朗、三浦智行、杉浦互、明里宏文：サル指向性 HIV-1 の感染個体における増殖効率を上昇させる要因、第 28 回日本エイズ学会学術集会、大阪、2014 年 12 月 3 日

G. 知的財産権の出願・登録状況
特になし

新規アジュバントによる HEV VLP に対する抗体誘導効果の検討

研究分担者 石井 孝司 国立感染症研究所ウイルス第二部 室長
研究協力者 加藤 孝宣 国立感染症研究所ウイルス第二部 室長
李 天成 国立感染症研究所ウイルス第二部 主任研究官
明里 宏文 京都大学霊長類研究所 教授
東濃 篤徳 京都大学霊長類研究所 特定研究員

研究要旨：JFH-1 株により C 型肝炎ウイルス（HCV）のウイルス培養系で作製した精製ウイルス粒子により中和活性の誘導が可能であることが明らかとなったが、強い免疫を誘導するためには効果的なアジュバントの開発が必要である。本研究では、抗原のモデルとして多量の VLP を調製できる E 型肝炎ウイルス（HEV）を使用し、不活化 HCV のワクチン効果を調べるために使用を考えているマーモセットでの新規アジュバントの免疫誘導効果を検討した。本新規アジュバント（K3-SPG）は、従来の CpG ODN と比べ強力な自然免疫応答およびアジュバント活性を有していることが示されている。

A. 研究目的

C 型肝炎ウイルス（HCV）感染は持続感染化し肝臓癌に至る重大な感染症であり、現在のウイルス保有者数は世界中で 1.7 億人（HIV 感染者の 4 倍）にのぼると言われているが、インターフェロン及びリバビリンの治療効果は不十分である。輸血用血液のスクリーニングにより新規感染者数は減少したが、医療従事者などハイリスクグループに予防的ワクチンが必要である。さらに薬物常用者の HCV 感染や HIV 感染者の HCV 重感染の予防が必要である。また、治療用ワクチンの効果も期待され、HCV のワクチン開発が望まれている。

JFH-1 株により C 型肝炎ウイルス（HCV）のウイルス培養系で作製した精製ウイルス粒子により中和活性の誘導が可能であることが明らかとなったが、強い免疫を誘導するためには効果的なアジュバントの開発が必要である。大阪大学免疫学フロンティア研究センター・石井 健先生らのグループは、CpG オリゴヌクレオチドを応用した新規アジュバントの開発を行った。本アジュバント（K3-SPG）は、従来の CpG ODN と比べ強力な自然免疫応答およびアジュバント活性を有していることが示されている。

本研究では、抗原のモデルとして多量の VLP を調製できる E 型肝炎ウイルス（HEV）を使用し、不活化 HCV のワクチン効果を調べるために使用を考えているマーモセットでの新規アジュバントの免疫誘導効果を検討した。

B. 研究方法

HEV の VLP をアジュバントと混合し、マーモセット 4 頭に接種した。接種量として、VLP は 1 頭あたり 2.5 μ g を設定した。アジュバントとしては、K3-SPG を 1 頭あたりそれぞれ 10、30、90 μ g、アジュバントのコントロールとして Alum を 250 μ g とし、VLP とアジュバントを混合後に生理食塩水で 1ml にメスアップし、大腿筋内(i.m.)2 ケ所、皮下(s.c.)2 ケ所に接種した。2 週後、4 週後、6 週後に採血し、抗 HEV-IgG と IgM を測定した。

C. 研究結果

図 1、図 2 に示す通り、HEV VLP は、アジュバントが K3-SPG、alum いずれの場合も抗 HEV IgM、IgG 抗体を誘導した。アジュバントが K3-SPG の場合は抗原接種後 12 日で抗 IgM、IgG 抗体ともに誘導されたが、alum の場合は 12 日ではいずれの抗体もほとんど誘導されておらず、接種後 30 日で誘導された。誘導後の抗体価は、アジュバントがいずれの場合もほとんど違いはなかった。

接種後の K3-SPG の副作用については、強い反応は観察されず、本動物モデルでは K3-SPG の安全性には大きな問題はないものと考えられた。

D. 考察

本研究により、K3-SPG は優れた免疫誘導効果を有することが示された。Alum と比較すると、早期に

免疫が誘導される傾向が確認されたが、Alum を接種された個体は、K3-SPG を接種された個体群と比較して老齢であり、免疫誘導能にある程度の影響を与えた可能性がある。今回検討した VLP は、いずれもエンベロープ蛋白を持たないキャプシドのみで構成されるウイルスであり、エンベロープ蛋白を持つウイルスの VLP や不活化粒子に対する効果についてはさらに検討が必要である。

E. 結論

HEV の VLP を用いて、新規アジュバントである K3-SPG に優れた免疫誘導効果があることを示した。また、本アジュバントには強い副作用がないことも確認することができた。今後はさらに K3-SPG のアジュバントとしての優位性を検討する。また、今回の実験から HEV の VLP 自体も免疫誘導能は優れていると考えられるため、本 VLP 中に HCV エンベロープ蛋白のエピトープを組み込んだキメラ VLP を作成し、HCV に対する免疫誘導効果についても検討する予定である。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Li T.C., Yang T., Yoshizaki S., Ami Y., Suzaki Y., Ishii K., Haga K., Nakamura T., Ochiai S., Wakita T. and John R. Construction and characterization of an infectious cDNA clone of rat hepatitis E virus. *Journal of General Virology* in press.
2. Shiota T., Li T.C., Yoshizaki S., Kato T., Wakita T. and Ishii K. Establishment of Hepatitis E Virus Infection-Permissive and -Nonpermissive Human Hepatoma. PLC/PRF/5 Subclones. *Microbiology and Immunology* in press.
3. Jiang X., Kanda T., Wu S., Nakamoto S., Saito K., Shirasawa H., Kiyohara T., Ishii K., Wakita T., Okamoto H. and Yokosuka O. Suppression of La Antigen Exerts Potential Antiviral Effects against Hepatitis A Virus. *PLOS One*, 9, e101993 (2014)
4. Li T.C., Yang, T., Shiota T., Yoshizaki S., Yoshida H., Saito M., Imagawa T., Malbas F., Lupisan S., Oshitani H., Wakita T. and Ishii K. Molecular detection of hepatitis E virus in rivers in the Philippines. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 90: 764-766 (2014)
5. Xeuatvongsa A., Komada K., Kitamura T., Vongphrachanh P., Pathammavong C.,

Phounphenghak K., Sisouk T., Phonekeo D., Sengkeopaseuth B., Som-Oulay V., Ishii K., Wakita T., Sugiyama M. and Hachiya M. Chronic Hepatitis B Prevalence among Children and Mothers: Results from a Nationwide, Population-Based Survey in Lao People's Democratic Republic. *PLOS One*, 9, e88829 (2014)

6. 石井孝司 環境中 A 型肝炎ウイルス遺伝子の検出と分子疫学的应用 臨床とウイルス 印刷中

7. 石井孝司 A 型肝炎、E 型肝炎 臨床と微生物 41: 72-78 (2014)

2. 学会発表

1. Ishii K. Epidemiological and genetic analysis of an outbreak of hepatitis A in Japan, 2014. The 11th Japan-Taiwan Symposium on New Technologies Applied to Public Health Including Foodborne Diseases and Drug Resistance. Taipei, Taiwan, September 11-12, 2014
2. Ishii K. Epidemiological and genetic analysis of a large outbreak of hepatitis A in Japan, 2014. The 10th China-Japan International Conference of Virology. Changchun, China, August 25-27, 2014
3. Li T.C., Ochiai K., Yang T., Yoshizaki S., Takeda N., Ishii K., Wakita T. Characterization of a case of hepatitis E that imported from Spain. 10th Asia Pacific Travel Health Conference, Ho Chi Minh City, Viet Nam, May 7-11, 2014
4. Ishii K. Kiyohara T., Yoshizaki S., Shimada T., Nakamura N., Nakashima K., Tada Y., Noda M., Wakita T. Molecular epidemiological analysis of recent hepatitis A in Japan and Asian countries. 10th Asia Pacific Travel Health Conference, Ho Chi Minh City, Viet Nam, May 7-11, 2014
5. Ishii K., Kiyohara T., Yoshizaki S., Tada T., Shimada T., Nakashima K., Noda M., Wakita T. Epidemiological and genetic analysis of hepatitis A in Japan. Blankenberge, Belgium, March 9-14, 2014
6. 石井孝司：日本における A 型肝炎の現状について、第 11 回日本小児消化管感染症研究会、平成 27 年 2 月、大阪

7. 清原知子、石井孝司、杉山真也、溝上雅史、脇田隆字：10-15 歳児における HBs 抗原保有率調査、第 18 回日本ワクチン学会、平成 26 年 12 月、福岡
 8. 福島慎二、清原知子、石井孝司、中野貴司、濱田篤郎：不活化 A 型肝炎ワクチンの互換性研究～エイムゲンと HAVRIX～、第 18 回日本ワクチン学会、平成 26 年 12 月、福岡
 9. 河端邦夫、清原知子、石井孝司、脇田隆字、金山敦宏、八幡裕一郎、松井珠乃、砂川富正、大石和徳：A 型肝炎の家族内感染についての疫学的解析（2014 年上半期を中心に）、第 18 回日本ワクチン学会、平成 26 年 12 月、福岡
 10. 塩田智之、李 天成、吉崎佐矢香、西村順裕、清水博之、下島昌幸、西條政幸、脇田隆字、石井孝司：E 型肝炎ウイルス感染性規定因子宿主候補に関する研究、第 62 回日本ウイルス学会、平成 26 年 11 月、横浜
 11. 石井孝司、清原知子、吉崎佐矢香、八幡裕一郎、河端邦夫、金山敦宏、山岸拓也、高橋琢理、有馬雄三、木下一美、齊藤剛仁、松井珠乃、大石和徳、砂川富正、脇田隆字：2014 年春季に日本で多発した A 型肝炎の分子疫学的解析、第 62 回日本ウイルス学会、平成 26 年 11 月、横浜
 12. 横川 寛、中村紀子、東濃篤徳、鈴木紗織、明里宏文、加藤孝宣、石井孝司、脇田隆字：培養細胞由来 HAV 粒子のマーモセットにおける抗 HCV 抗体誘導能の検討、第 62 回日本ウイルス学会、平成 26 年 11 月、横浜
 13. 石井孝司：日本における A 型肝炎の現状について、第 29 回関東甲信静支部ウイルス研究部会、平成 26 年 9 月、長野
- G. 知的所有権の取得状況
なし