

厚生労働科学研究費補助金（創薬等ヒューマンサイエンス総合研究事業）
分担研究者研究報告書

エイズ医薬品候補物質のスクリーニング研究

分担研究者 野口有三 横浜市衛生研究所

研究要旨

平成 16 年度に民間企業・大学等から提供された抗 HIV 増殖抑制候補医薬品 47 検体について、MT-4 細胞の HIV-1 感染による細胞障害性の抑制を指標としたマイクロプレート法（5 日間観察法）を用いたスクリーニング検査を実施した。その結果、47 検体の全てに有効な抗 HIV 増殖抑制候補医薬品は認められなかった。

1. 研究目的

エイズ治療薬の開発を目的として、平成 16 年度に依頼されたサンプル（47 検体）について抗 HIV 増殖抑制活性をスクリーニング検査し、その有効性を検討した。

2. 研究方法

スクリーニングは、MT-4 細胞の HIV-1 感染による細胞障害性の抑制を指標としたマイクロプレート法（5 日間観察法）を使用した。

方法の概略を述べると、ヒト T 細胞性白血病ウイルス I 型（HTLV-1）に持続感染している T-細胞株である MT-4 細胞に HIV-1（HTLV-III B 株）を 0.001TCID₅₀/cell の割合で 1 時間感染させた。その後、2 倍段階希釈した薬剤を含む RPMI1640 培養液（10% ウシ胎児血清および抗生物質を含む）に 1.5×10^5 cells/ml の濃度で浮遊させ、96 穴の平底マイクロプレートにて 200 μ l/well で培養する。培養開始後 5 日目に検鏡により MT-4 細胞の HIV-1 感染による細胞変性効果（CPE）の有無および細胞毒性を観察し、抗 HIV 効果を判定した。

3. 研究成果

本年度、当衛生研究所の担当分 47 検体に

ついて、スクリーニング検査を実施した結果では、試験薬剤濃度（125～0.12 μ g/ml）の範囲内で、HIV 増殖抑制に有効な薬剤は全て認められなかった。

4. 考 察

各機関で統一された検査法である平底プレートを用いた「5 日間観察法」によりスクリーニング検査を実施した。試験薬剤濃度（125～0.12 μ g/ml）の範囲内では、本年度の 47 検体は全て有効な薬剤は見出せなかったが、No.04207 と No.04223 の 2 検体については、その試験薬剤濃度範囲内では細胞毒性も認められなかった。

5. 結 論

本年度の 47 検体についてスクリーニング検査を実施した結果、HIV 増殖抑制に有効な薬剤は全て認められなかった。

6. 研究発表

- 1) 論文発表：国立医薬品食品衛生研究所報告
- 2) 学会発表
未定

平成 16 年度抗 HIV 医薬品候補物質スクリーニング試験結果

測定濃度範囲は全て、125~0.12 ($\mu\text{g/ml}$)

検体 NO.	細胞毒性濃度 ($\mu\text{g/ml}$)	抗 HIV 抑制	検体 NO.	細胞毒性濃度 ($\mu\text{g/ml}$)	抗 HIV 抑制
04206	31.3 以上	(-)	04230	125 以上	(-)
04207	範囲内で (-)	(-)	04231	3.91 以上	(-)
04208	125 以上	(-)	04232	62.5 以上	(-)
04209	125 以上	(-)	04233	62.5 以上	(-)
04210	62.5 以上	(-)	04234	62.5 以上	(-)
04211	125 以上	(-)	04235	125 以上	(-)
04212	125 以上	(-)	04236	62.5 以上	(-)
04213	125 以上	(-)	04237	62.5 以上	(-)
04214	125 以上	(-)	04238	125 以上	(-)
04215	125 以上	(-)	04239	31.3 以上	(-)
04216	125 以上	(-)	04240	125 以上	(-)
04217	62.5 以上	(-)	04241	31.3 以上	(-)
04218	15.6 以上	(-)	04242	125 以上	(-)
04219	125 以上	(-)	04243	125 以上	(-)
04220	31.3 以上	(-)	04244	31.3 以上	(-)
04221	62.5 以上	(-)	04245	62.5 以上	(-)
04222	62.5 以上	(-)	04246	125 以上	(-)
04223	範囲内で (-)	(-)	04247	125 以上	(-)
04224	31.3 以上	(-)	04248	15.6 以上	(-)
04225	125 以上	(-)	04249	125 以上	(-)
04226	31.3 以上	(-)	04250	125 以上	(-)
04227	15.6 以上	(-)	04251	31.3 以上	(-)
04228	7.81 以上	(-)	04252	31.3 以上	(-)
04229	31.3 以上	(-)			

MAGIC-5A 細胞を用いた抗 HIV 活性スクリーニング試験

分担研究者 大竹 徹 (大阪府立公衆衛生研究所ウイルス課)
研究協力者 森 治代 川畑拓也 小島洋子 (同上)

研究概要

企業および大学より提供されたサンプル 259 件についてマクロファージ好性ウイルスの MAGIC-5A 細胞における抗ウイルス活性についてスクリーニング試験を行った。その結果、22 検体に抗 HIV 活性が認められ、そのなかで 6 検体は IC₅₀ 値が 10 μ g/ml 以下という比較的強い抗 HIV 活性が認められた。これら活性を示した検体のなかには T 細胞好性ウイルスの T 細胞における抗ウイルス試験で活性を示さなかったものが 17 件あり、これらの物質が人における有効な抗ウイルス剤となる可能性を示した。

目的

新たな作用メカニズムを持つ抗 HIV 剤の出現が待たれている現状において、ウイルスの細胞への侵入過程を阻害する薬剤の開発は重要なターゲットのひとつとなっている。これらの薬剤を見出すためには T 細胞好性(X4)ウイルスのみならずマクロファージ好性(R5)ウイルスの増殖に及ぼす影響も検討する必要がある。今回マクロファージ好性ウイルスの増殖を簡便に捉えることができる MAGIC-5A 細胞を用いた抗 HIV 活性スクリーニング試験を行った。

方法

ウェルあたり 10,000 個の MAGIC5A 細胞を 96 穴平底プレートにまき、細胞がプレート底面に張り付くまで 37°C インキュベーター内で培養した。培養液を取り除いた後、培養液で 2 段階希釈 (希釈倍数は 5 倍) した薬剤液を加えた。その後 HIV-1 Ba-L 株を 100. 200BFU/50 μ L になるように DEAE-dextran 添加培養液で調整し加えた。37°C の CO₂ インキュベーターで 48 時間培養した。培養液を取り除き固定液 (1% formaldehyde and 0.2% glutaraldehyde in PBS) を加えて室温で 5 分間インキュベートし、洗浄の後、染色液 (4

mM potassium ferrocyanide, 4 mM potassium ferricyanide, 2 mM MgCl₂ and 400 μ g/ml X-gal.) を加えて、37°C で 1 時間インキュベートした。染色液を取り除き洗浄し、青く染まった細胞の数を顕微鏡下でカウントした。抗 HIV 活性陽性検体として TAK-779 および AZT を用いた。

結果

今回、259 検体についてマクロファージ好性 HIV-1 株の MAGIC-5A 細胞での増殖抑制活性の有無を調べたが、22 検体に抗ウイルス活性を認めた (表 1)。そのうち 2 検体 (No.4158, 4204) は 50% 抑制濃度 (IC₅₀) が 1.9 および 2.6 μ g/mL と強い抗ウイルス活性を示した。さらに 4 検体 (No.4175, 4461, 4462, 4464) の IC₅₀ は 7.2. 10 と比較的強い抗ウイルス効果を示した。その他 16 検体の IC₅₀ は 10.5. 260 μ g/mL で比較的弱い活性を示した。

考察

今回のスクリーニング研究においてマクロファージ好性ウイルスの増殖を抑制した検体が 22 件認められた。そのうち 6 件はその抑

制濃度が10 μ g/mL以下と比較的強い抗ウイルス作用が示された。

興味深いことにIC50が2 μ g/mL前後という強い抗ウイルス効果を示した2件(No.4158,4204)を含めて17件の検体が今回のMAGIC-5アッセイのみで活性が示され、T細胞好性ウイルスのT細胞(MT-4細胞)における抗ウイルス試験で活性が示されなかったことである。このことはこれら17件の検体がマクロファージ好性ウイルスのみの増殖を選択的に抑制する性質をもつ可能性が考えられた。

HIV感染者において感染初期から発症直前至る長期間にわたって、細胞のCD4分子の他にセカンドレセプターとしてCCR5を用いるマクロファージにて増殖するタイプのウイルスが大勢を示していることが知られているが、抗HIV剤としてはこのようなマクロファージ好性ウイルスを抑制する薬剤の利点は大きいものと考えられる。さらにこれらの物質についてCCR5とマクロファージ好性ウイルスの反応を抑制するものであるか、あるいは今回用いたBa-L株以外のマクロファージ好性ウイルスへの作用などを詳細に検討する必要があると思われる。

発表論文

1. Urata H, Kumashiro T, Kawahata T, Otake T, Akagi M, Anti-HIV-1 activity and mode of action of mirror image oligodeoxynucleotide analogue of zintevir, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 313, 55-61, 2004
2. 森 治代、小島洋子、川畑拓也、大竹 徹、 巽 正志、コレセプター阻害剤を用いた

R5/X4 ウイルス測定法、MINOPHAGEN MEDICAL REVIEW vol.49, 81-82, 2004

3. Dan Turner, Bluma Brenner, Daniela Moisi, Mervi Detorio, Raymond Cesaire, Takashi Kurimura, Haruyo Mori, Max Essex, Shlomo Maayan and Mark A. Wainberg, Nucleotide and Amino Acid Polymorphisms at Drug Resistance Sites in Non-B-Subtype Variants of Human Immunodeficiency Virus Type 1, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48, 2993-2998, 2004
4. 大竹 徹、ウイルスの高圧不活化と血液製剤への利用、FFI ジャーナル、210(1)、44-48、2005

学会発表

1. 大竹 徹、川畑拓也、森 治代、小島洋子、早川 潔、凍結昇圧法によるヒト免疫不全ウイルスの不活化、第14回抗ウイルス化学療法研究会、名古屋、2004
2. 森 治代、小島洋子、川畑拓也、大竹 徹、未治療 HIV-1 感染者に検出された V108I 変異の NVP 耐性獲得に対する影響、第18回日本エイズ学会、静岡、2004

表 1 検体の MAGIC-5 アッセイおよび MT-4 細胞アッセイの結果

検体番号	MAGIC-5 アッセイ (IC50)	MT-4 細胞アッセイ (IC100)
4030	NE	7.8
4042	NE	2.0
4056	260	1,950
4158	1.9	NE
4169	26.0	NE
4173	21.5	NE
4175	8.4	NE
4204	2.6	NE
4412	30.5	NE
4415	30.0	125
4419	NE	250
4422	NE	1.95
4423	NE	250
4431	35.0	NE
4432	21.0	NE
4438	NE	250
4445	44.0	NE
4453	NE	12.5
4454	NE	25
4455	NE	6.25
4457	NE	12.5
4459	NE	25
4353	19.5	NE
4362	NE	25
4377	NE	0.03
4380	10.5	NE
4391	NE	0.8
4394	15.0	NE
4397	NE	0.16
4406	22.0	NE
4410	NE	100
4494	84.0	NE
4495	39.0	NE
4497	56.0	NE
4503	67.0	NE
4461	10.0	12.0
4462	8.8	9.0
4464	7.2	8.0

単位は $\mu\text{g}/\text{mL}$

厚生労働科学研究費補助金（創薬等ヒューマンサイエンス総合研究事業）
分担研究報告書

MAGIC5A細胞を用いたスクリーニング試験

分担研究者 山本直彦（名古屋大学大学院医学系研究科）
研究協力者 森下高行（愛知県食品衛生検査所）
佐藤克彦（愛知県衛生研究所）

研究要旨

MAGIC5A細胞でスクリーニングした246検体のうち、5検体において弱いながら HIV-1 抑制効果が認められた。この5検体につき、50%ウイルス増殖抑制濃度（IC₅₀；50% Inhibitory Concentration）を測定し、細胞毒性との間の選択性を求めたところ、それぞれ4.5倍、4.1倍、7.7倍、2.7倍、10.8倍と選択性はあまり認められなかった。

1. 研究目的

MT-4細胞による T-tropic virus に対する抗 HIV 活性のスクリーニングが終了した246検体について、MAGIC5A細胞と M-tropic HIV-1 を用い、CCR5 に対する増殖抑制活性をスクリーニングした。

2. 研究方法

1) スクリーニング試験

実験当日の朝、MAGIC5細胞を 1×10^5 cells/ml の濃度で 2.5% FCS 添加 DMEM に浮遊し 100 μ l ずつ 96 穴平底プレートに分注した。5 から 6 時間培養後、細胞が平底プレートにしっかりと張り付いていることを確認し、培養上清を取り除いた。薬剤を MT-4 細胞によるスクリーニングの結果、細胞毒性がないと思われる最大濃度とその 5 倍希釈した 2 点の濃度に培養液を用いて希釈し、各穴に 50 μ l ずつ加えた。HIV-1 Ba-L 株を 100~200BFU/50 μ l になるように 40 μ

l/ml DEAE-dextran（最終濃度 20 μ l/ml）添加培養液で調整し、薬剤添加プレートに 50 μ l 加え、37°C の CO₂ インキュベーターで 48 時間培養した。培養液を取り除いた後、所定の方法により染色し、ブランク数により判定した。すなわち、

細胞毒性 ◎：非感染細胞と同程度の細胞増殖が認められる。
○：細胞増殖が認められる
×：薬剤の細胞毒性により増殖が阻害されている。

ウイルスによる増殖

++：顕著なブランク数が認められる。
+ 半数程ブランク数が認められる。
±：わずかにブランク数が認められる。
.：ブランク数が全く認められない。

3. 結果および考察

今年度スクリーニングした246検体のうち、04067 (T011), 04092 (T036), 04226 (T174), 04315 (T263), 04351 (T299) の5検体に moderate な抗 HIV 活性がみられた (表1—3)。これら M-tropic virus に対し、比較的効果のあった薬剤の 50% ウイルス増殖抑制濃度 (IC₅₀; 50% Inhibitory Concentration) を測定し、細胞毒性との間の選択性を求めたところ、それぞれ 4.5 倍、4.1 倍、7.7 倍、2.7 倍、10.8 倍と軽度であった (表4)。なお、対照薬剤として使用した TAK779 および AZT の IC₅₀ はそれぞれ 0.07 μM と 0.005 μM であった。

4. 研究発表

- 1) H. Nagai, K. Wada, T. Morishita, M. Utsumi, Y. Nishiyama and T. Kaneda
New estimation method for highly sensitive quantitation of Human Immunodeficiency Virus Type 1 DNA and its application. J. Virol. Methods, in press.
- 2) Dhole TN, N. Yamamoto. Presence of Primary mutations Associated with Protease inhibitor Resistance in Antiviral-naïve HIV-1 infected patient in India 12th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections, February 2005. Boston
- 3) Dhole TN, N. Yamamoto A T69N and K74I mutation in HIV-1 clade C viruses exposed to Protease inhibitors confers cross resistance

to nucleoside reverse transcriptase inhibitors 12th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections, February 2005. Boston

- 4) 山本直彦、森下高行、佐藤克彦、森治代、川畑拓也、大竹徹、伊部史朗、金田次弘 『Non-subtype B型 HIV にみられる薬剤耐性関連遺伝子に関する研究』(日本ウイルス学会、2004年、横浜)
- 5) 山本直彦、森下高行、佐藤克彦、伊部史朗、金田次弘 『ケニアにおける未治療 HIV 感染者の薬剤耐性遺伝子とサブタイプの流行状況について』(日本エイズ学会、2004年、静岡)

表1

コード番号	サンプル略名	測定濃度 ($\mu\text{g/ml}$)	判定	測定濃度 ($\mu\text{g/ml}$)	判定	コード番号	サンプル略名	測定濃度 ($\mu\text{g/ml}$)	判定	測定濃度 ($\mu\text{g/ml}$)	判定
04057	T001	62.5	×	12.5	++	04107	T051	62.5	++	12.5	++
04058	T002	125	++	25	++	04108	T052	62.5	++	12.5	++
04059	T003	125	++	25	++	04109	T053	2	++	4	++
04060	T004	125	×	25	++	04110	T054	3.9	++	0.8	++
04061	T005	31.3	×	6.3	++	04111	T055	31.3	×	6.3	++
04062	T006	125	++	25	++	04112	T056	15.7	×	3.1	++
04063	T007	125	×	25	++	04113	T057	31.3	×	6.3	++
04064	T008	125	×	25	++	04114	T058	62.5	++	12.5	++
04065	T009	125	×	25	++	04115	T059	2	++	0.4	++
04066	T010	31.3	×	6.3	++	04116	T060	3.9	++	0.4	++
04067	T011	31.3	×	6.3	±	04117	T061	31.3	+	6.3	++
04068	T012	31.3	×	6.3	++	04118	T062	62.5	++	12.5	++
04069	T013	62.5	×	12.5	++	04119	T063	7.8	++	1.6	++
04070	T014	125	×	25	++	04120	T064	31.3	++	6.3	++
04071	T015	62.5	×	12.5	++	04121	T065	31.3	++	6.3	++
04072	T016	125	++	25	++	04122	T066	31.3	++	6.3	++
04073	T017	250	×	50	++	04123	T067	31.3	++	6.3	++
04074	T018	62.5	×	12.5	++	04124	T068	15.7	++	3.1	++
04075	T019	62.5	++	12.5	++	04125	T069	31.3	++	6.3	++
04076	T020	125	×	25	++	04126	T070	62.5	++	12.5	++
04077	T021	12.5	×	2.5	++	04127	T071	62.5	++	12.5	++
04078	T022	250	×	50	++	04128	T072	62.5	++	12.5	++
04079	T023	250	++	50	++	04129	T073	125	++	25	++
04080	T024	250	×	50	++	04130	T074	15.7	++	3.1	++
04081	T025	31.3	++	6.3	++	04131	T075	250	++	50	++
04082	T026	31.3	×	6.3	++	04132	T077	2.0	++	0.4	++
04083	T027	125	++	25	++	04133	T078	62.5	++	12.5	++
04084	T028	250	×	50	++	04134	T079	0.5	++	0.1	++
04085	T029	125	×	25	++	04135	T080	62.5	++	12.5	++
04086	T030	250	×	50	++	04136	T081	1.0	++	0.2	++
04087	T031	62.5	×	12.5	++	04137	T082	7.8	++	1.6	++
04088	T032	125	++	25	++	04138	T083	31.3	++	6.3	++
04089	T033	15.7	×	3.1	++	04139	T084	15.7	++	3.1	++
04090	T034	125	++	25	++	04140	T085	15.7	++	3.1	++
04091	T035	125	×	25	++	04141	T086	31.3	++	6.3	++
04092	T036	62.5	±	12.5	++	04142	T087	62.5	++	12.5	++
04093	T037	250	×	50	++	04143	T088	31.3	++	6.3	++
04094	T038	125	×	25	++	04144	T089	15.7	++	3.1	++
04095	T039	250	×	50	++	04145	T090	15.7	++	3.1	++
04096	T040	125	×	25	++	04146	T091	31.3	++	6.3	++
04097	T041	250	++	50	++	04147	T092	62.5	++	12.5	++
04098	T042	31.3	+	6.3	++	04148	T093	62.5	++	12.5	++
04099	T043	125	×	25	++	04149	T094	62.5	++	12.5	++
04100	T044	250	++	50	++	04150	T095	62.5	++	12.5	++
04101	T045	250	++	50	++	04151	T096	31.3	++	6.3	++
04102	T046	62.5	×	12.5	++	04152	T097	31.3	++	6.3	++
04103	T047	250	++	50	++	04153	T098	31.3	++	6.3	++
04104	T048	250	×	50	++	04154	T099	15.7	++	3.1	++
04105	T049	125	×	25	++	04155	T100	125	++	25	++
04106	T050	125	++	25	++						

表2

コード番号	サンプル略名	測定濃度 ($\mu\text{g/ml}$)	判定	測定濃度 ($\mu\text{g/ml}$)	判定	コード番号	サンプル略名	測定濃度 ($\mu\text{g/ml}$)	判定	測定濃度 ($\mu\text{g/ml}$)	判定
04206	T151	31.3	++	6.3	++	04253	T201	125	++	25	++
04207	T152	62.5	++	12.5	++	04254	T202	62.5	++	12.5	++
04208	T153	62.5	++	12.5	++	04255	T203	62.5	++	12.5	++
04209	T154	62.5	++	12.5	++	04256	T204	2.0	++	0.4	++
04210	T155	62.5	++	12.5	++	04257	T205	31.3	++	6.3	++
04211	T156	62.5	++	12.5	++	04258	T206	62.5	++	12.5	++
04212	T157	62.5	++	12.5	++	04259	T207	62.5	++	12.5	++
04213	T158	62.5	++	12.5	++	04260	T208	31.3	++	6.3	++
04214	T159	62.5	++	12.5	++	04261	T209	62.5	++	12.5	++
04215	T160	62.5	++	12.5	++	04262	T210	62.5	++	12.5	++
04216	T161	62.5	++	12.5	++	04263	T211	62.5	++	12.5	++
04217	T162	62.5	++	12.5	++	04264	T212	15.7	++	3.1	++
04218	T163	15.7	++	3.1	++	04265	T213	62.5	×	12.5	++
04219	T165	62.5	++	12.5	++	04266	T214	62.5	++	12.5	++
04220	T166	31.3	++	6.3	++	04267	T215	62.5	×	12.5	++
04221	T168	62.5	++	12.5	++	04268	T216	31.3	×	6.3	++
04222	T170	62.5	++	12.5	++	04269	T217	31.3	++	6.3	++
04223	T171	62.5	++	12.5	++	04270	T218	31.3	++	6.3	++
04224	T172	31.3	++	6.3	++	04271	T219	62.5	++	12.5	++
04225	T173	62.5	++	12.5	++	04272	T220	15.7	×	3.1	++
04226	T174	62.5	±	12.5	++	04273	T221	62.5	++	12.5	++
04227	T175	15.7	++	3.1	++	04274	T222	31.3	×	6.3	++
04228	T176	15.7	++	3.1	++	04275	T223	31.3	++	6.3	++
04229	T177	31.3	++	6.3	++	04276	T224	1.0	++	0.2	++
04230	T178	62.5	++	12.5	++	04277	T225	0.032	++	0.006	++
04231	T179	3.9	++	0.8	++	04278	T226	62.5	++	12.5	++
04232	T180	62.5	++	12.5	++	04279	T227	31.3	×	6.3	++
04233	T181	62.5	++	12.5	++	04280	T228	15.7	++	3.1	++
04234	T182	62.5	++	12.5	++	04281	T229	62.5	++	12.5	++
04235	T183	62.5	++	12.5	++	04282	T230	62.5	++	12.5	++
04236	T184	62.5	++	12.5	++	04283	T231	62.5	++	12.5	++
04237	T185	62.5	+	12.5	++	04284	T232	62.5	×	12.5	++
04238	T186	62.5	++	12.5	++	04285	T233	31.3	++	6.3	++
04239	T187	31.3	++	6.3	++	04286	T234	31.3	++	6.3	++
04240	T188	62.5	++	12.5	++	04287	T235	62.5	++	12.5	++
04241	T189	31.3	+	6.3	++	04288	T236	31.3	++	6.3	++
04242	T190	62.5	++	12.5	++	04289	T237	31.3	×	6.3	++
04243	T191	62.5	++	12.5	++	04290	T238	62.5	×	12.5	++
04244	T192	62.5	++	12.5	++	04291	T239	3.9	++	0.8	++
04245	T193	62.5	++	12.5	++	04292	T240	31.3	×	6.3	++
04246	T194	62.5	++	12.5	++	04293	T241	31.3	×	6.3	++
04247	T195	62.5	++	12.5	++	04294	T242	62.5	++	12.5	++
04248	T196	7.8	++	1.6	++	04295	T243	62.5	++	12.5	++
04249	T197	62.5	++	12.5	++	04296	T244	62.5	++	12.5	++
04250	T198	62.5	++	12.5	++	04297	T245	15.7	++	3.1	++
04251	T199	31.3	++	6.3	++	04298	T246	62.5	++	12.5	++
04252	T200	31.3	++	6.3	++	04299	T247	31.3	++	6.3	++
						04300	T248	31.3	++	6.3	++
						04301	T249	31.3	++	6.3	++
						04302	T250	62.5	++	12.5	++

表3

コード番号	サンプル略名	測定濃度		測定濃度	
		($\mu\text{g/ml}$)	判定	($\mu\text{g/ml}$)	判定
04303	T251	31.3	++	6.3	++
04304	T252	62.5	++	12.5	++
04305	T253	125	++	25	++
04306	T254	31.3	+	6.3	++
04307	T255	62.5	++	12.5	++
04308	T256	62.5	++	12.5	++
04309	T257	125	++	25	++
04310	T258	31.3	++	6.3	++
04311	T259	62.5	++	12.5	++
04312	T260	62.5	++	12.5	++
04313	T261	62.5	++	12.5	++
04314	T262	125	++	25	++
04315	T263	7.8	±	1.6	++
04316	T264	31.3	×	6.3	++
04317	T265	62.5	++	12.5	++
04318	T266	125	++	25	++
04319	T267	62.5	++	12.5	++
04320	T268	31.3	++	6.3	++
04321	T269	62.5	++	12.5	++
04322	T170	62.5	++	12.5	++
04323	T271	62.5	++	12.5	++
04324	T272	125	++	25	++
04325	T273	62.5	+	12.5	++
04326	T274	125	++	25	++
04327	T275	125	++	25	++
04328	T276	15.7	++	3.1	++
04329	T277	62.5	++	12.5	++
04330	T278	62.5	++	12.5	++
04331	T279	1.0	++	0.2	++
04332	T280	125	++	25	++
04333	T281	2.0	++	0.4	++
04334	T282	62.5	++	12.5	++
04335	T283	62.5	+	12.5	++
04336	T284	62.5	++	12.5	++
04337	T285	125	+	25	++
04338	T286	125	++	25	++
04339	T287	62.5	++	12.5	++
04340	T288	125	++	25	++
04341	T289	31.3	++	6.3	++
04342	T290	31.3	++	6.3	++
04343	T291	31.3	++	6.3	++
04344	T292	62.5	++	12.5	++
04345	T293	125	++	25	++
04346	T294	62.5	++	12.5	++
04347	T295	62.5	++	12.5	++
04348	T296	62.5	++	12.5	++
04349	T297	62.5	++	12.5	++
04350	T298	125	×	25	++
04351	T299	62.5	±	12.5	+
04352	T300	62.5	++	12.5	++

表4:M-tropic virusに対する有効濃度(IC₅₀)と選択性

コード番号	サンプル略名	A:有効濃度 ($\mu\text{g/ml}$)	B:細胞毒性濃度 ($\mu\text{g/ml}$)	選択性 (B/A)
04067	T011	3.5	15.9	4.5
04092	T036	30.2	125	4.1
04226	T174	16.2	125	7.7
04315	T263	2.9	7.8	2.7
04351	T299	11.6	125	10.8

GFP 発現を指標とした HIV 感染検出系の開発

所属 群馬大学大学院医学系研究科分子予防医学
分担研究者 星野 洪郎
協力者 大槻 貴博、清水 宣明

研究要旨 GFP 発現を指標として HIV 感染を検出する indicator cell line を作成した。この indicator cell line は GFP 発現を指標として HIV/SIV 感染 48 時間でコレセプター使用能特異的に検出することが可能であった。AZT、dextran sulfate の抗 HIV 活性は AZT (IC₅₀: 2ng/ml、IC₉₀: 27ng/ml)、dextran sulfate (IC₅₀: 0.6i g/ml、IC₉₀: 3.8i g /ml) であった。作成した indicator cell は、HIV の感染を迅速かつ特異的に検出することが可能であり、抗 HIV 剤スクリーニングへの応用が可能であった。

A. 研究目的

Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) は、後天性免疫不全症候群 (AIDS) の原因ウイルスである。感染後 5・10 年の無症候期の間、subtype B では CD4 レセプターと CCR5 コレセプターを感染に使用するマクロファージ指向性の HIV-1 (R5 指向性) が多く検出されるが、AIDS 発症期には CD4 と CXCR4 を使用する樹立 T 細胞株指向性の HIV-1 (X4 指向性) や、マクロファージと樹立 T 細胞株の両指向性を持つ HIV-1 (R5X4 指向性) の検出が優位となる。現在、これらの HIV-1 を検出するために、MAGIC-5A 細胞 (HeLa/CD4/LTR- \hat{a} -gal) や、GHOST 細胞 (HOS/CD4/coreceptor/LTR-GFP) などの indicator cell が多くの実験室で使用されている。しかし、MAGIC-5A 細胞では、感染を検出するために細胞の固定や薬剤処理を必要とするので、細胞を生細胞のままで経時的に観察することが不可能である。また、MAGIC-5A

細胞と GHOST 細胞は、少量の CXCR4 や GPR1 などの HIV コレセプターとして機能する GPCR 発現しており、HIV-1 感受性のバックグラウンドがあるため、ウイルスの細胞指向性やコレセプター阻害剤の抗ウイルス活性などの正確な判定をすることが難しいと考えられる。

我々の研究室では、ヒトグリオーマ由来の NP-2 細胞を用いたコレセプターアッセイシステムを開発してきた。NP-2 細胞は、CD4 および既知のコレセプターの発現がない。CD4 のみを発現させた NP-2/CD4 細胞は、すべての HIV および simian immunodeficiency virus (SIV) に抵抗性を示す。しかし、この細胞にコレセプター遺伝子を導入すると HIV/SIV 高感受性に変化するため、コレセプターの機能解析や、抗 HIV 薬の探索および検定に非常に有効である。本研究では、NP-2 細胞を用い GFP の発現を指標として R5 指向性、X4 指向性 HIV-1 感染の検出と定量が可能な indicator

cell の作成を試みた。

B. 研究方法

HIV-1 の long Terminal Repeat (LTR) の promoter で発現制御される *green fluorescent protein* (GFP) 遺伝子を持つ plasmid (pHIVLTR-GFP) を、CD4 と CCR5 あるいは CXCR4 を発現させた NP-2 細胞 (NP-2/CD4/CCR5 および NP-2/CD4/CXCR4) へ導入した。細胞のクローニングを行い、HIV-1 感染前には細胞核内の GFP 蛍光が極めて低く、HIV-1 感染後に増大するクローン (N4R5/GFP、N4X4/GFP) を分離した。また、amphotropic-MLV (A-MLV/CXCR4) を用いて CXCR4 遺伝子を N4R5/GFP 細胞に導入し、X4 指向性の HIV-1 感染によって特異的に GFP 蛍光が増大するクローン (N4R5X4/GFP) を分離した。GFP 発現誘導が HIV-1 Tat 依存적であるかを検討するために、*tat* 遺伝子を持つ amphotropic -MLV (A-MLV/*tat*) を N4X4/GFP 細胞に感染させ、48 時間後に蛍光顕微鏡下で観察した。Indicator cell における CD4 とコレセプター (CCR5、CXCR4) の発現強度を調べるために、flow cytometry 解析を行った。HIV-1 Ba-L 株を段階希釈して、N4R5/GFP 細胞に感染させ、0、1、2、3、4、5 日後に GFP 発現細胞率を算出した。N4R5/GFP 細胞に HIV-1 を感染させ、0、2、4、6 日後に GFP 発現細胞率と immunofluorescence assay (IFA) による HIV 抗原陽性細胞率を算定し両者の相関性を調べた。Indicator cell を 96 穴プレートに播種し、24 時間後に逆転写酵素活性で 300cpm 相当の HIV-1 を感染させ、48 時間後に蛍光顕微鏡下で GFP 発現細胞を観察して、コレセプター利用能に依存した感染特異的 GFP 発現誘導を検討した。段階希釈した様々な細胞指向性

の HIV/SIV を indicator cell に感染させ、48 時間後に蛍光顕微鏡下で GFP 陽性細胞数を測定しウイルスカ価を定量した。Indicator cell を 96well plate に播種し、24 時間後に段階希釈した AZT、dextran sulfate を加えて HIV-1 GUN-1wt 株を 3×10^2 IU/well で感染させ、GFP を指標にして抗 HIV 薬の感染阻害効果を定量した。48 時間後の GFP 陽性細胞数で、50% 阻害効果 (IC₅₀)、90% 阻害効果 (IC₉₀) を算出した。MAGI 細胞と比較するために、代替として HeLaT4/LTR-GFP 細胞を作成した。この細胞と N4X4/GFP 細胞の X4 ウイルスに対する感染の検出感度を比較した。両細胞は 96well plate に播種し、24 時間後に HIV-1 III_B 株を 3×10^2 IU/well で感染させ、48 時間後に GFP 陽性細胞数を測定した。

C. 研究結果

NP-2/CD4/GPCR/LTR-GFP 細胞の作製

HIV-1 感染 2.3 日後に合胞体を形成すると共に GFP の蛍光が有意に増大する 3 つのクローン (N4R5/GFP#2-51、N4X4/GFP#5-3-22、N4R5X4/GFP#8-22) が得られた。(図 1) これらの細胞は、HIV-1 が感染した時のみ、GFP の蛍光が検出された。

Tat 依存적 GFP 発現誘導

A-MLV/*tat* を N4X4/GFP 細胞に感染させ、48 時間後に蛍光顕微鏡下で GFP 発現を観察した。HIV-1 Tat 発現依存적 GFP 発現誘導が細胞核内で観察された。N4R5/GFP 細胞と N4R5X4/GFP 細胞でも同様の結果を得た。

Indicator cell における CD4 とコレセプター発現

Indicator cell における CD4、CCR5、CXCR4

の発現強度を flow cytometry を用いて解析した。N4R5/GFP 細胞表面上の発現は、CD4 (10%)、CCR5 (23.1%)、CXCR4 (0%) であった。N4X4/GFP 細胞では、CD4 (9.5%)、CCR5 (0%)、CXCR4 (47.4%) であった。

HIV-1 感染による N4R5/GFP 細胞の GFP 発現

HIV-1 の Ba-L 株を段階希釈して N4R5/GFP 細胞に感染させ、0、1、2、3、4、5 日後に GFP 発現細胞率を算出した。GFP 発現誘導はウイルス濃度に比例し、感染後の日数が進むにつれてその率が増加した。感染後 2 日から 3 日で、ウイルス希釈比と GFP 発現細胞率とが相関した。

HIV 感染による GFP 発現細胞率と HIV-1 抗原陽性率の比較

N4R5/GFP 細胞に HIV-1 を感染させ、0、2、4、6 日後に GFP 発現細胞率と Immunofluorescent assay (IFA) による HIV 抗原陽性細胞率を算定し、比較した。GFP 発現細胞率は、IFA による HIV 抗原の陽性率と相関した。

HIV-1 のコレセプター利用能に依存した感染特異的 GFP 発現誘導 (図 2)

Indicator cell を 96 穴プレートに播種し、24 時間後に逆転写酵素活性で 300cpm 相当の HIV-1 を感染させ、48 時間後に蛍光顕微鏡下で GFP 発現細胞を算定した。細胞指向性の異なる HIV-1 感染では、それぞれのウイルスのコレセプター利用能と特異的な GFP の発現がみられた。

HIV-1、HIV-2 および SIV の力価と細胞指向

性の決定

段階希釈した様々な細胞指向性を持つ HIV/SIV を indicator cell に感染させ、感染 48 時間後に蛍光顕微鏡下で GFP 陽性細胞数を測定してウイルス力価を定量した。HIV-1 だけでなく HIV-2 と SIV のコレセプター利用能特異的感染を検出し、ウイルス力価を定量した。

抗ウイルス剤の感染阻害効果の定量 (図 3)

N4R5/GFP 細胞を 96 穴プレートに播種し、24 時間後に段階希釈した AZT、dextran sulfate を 50 μ l 添加して、GUN-1wt 株を 3 \times 10² IU/50 μ l で感染させた。感染 48 時間後、蛍光顕微鏡下で GFP 発現細胞数を測定し、IC₅₀、IC₉₀ を算出した。AZT および dextran sulfate は共に薬剤濃度依存的に GFP 発現を抑制した。AZT の IC₅₀ は 2ng/ml、IC₉₀ は 27ng/ml であった。Dextran sulfate の IC₅₀ は 0.6 μ g/ml、IC₉₀ は 3.8 μ g/ml であった。

HeLa/CD4/LTR-GFP 細胞と N4X4/GFP 細胞の HIV/SIV 感染感受性の比較

MAGI 細胞の代替として作成した HeLaT4/LTR-GFP 細胞と N4X4/GFP 細胞を用いて、X4 ウイルスに対する感染の検出感度を比較した。両細胞は 96well plate に播種し、24 時間後に、HIV-1 III_B 株を 3 \times 10² IU/well で感染させ、48 時間後に GFP 陽性細胞数を測定した。N4X4/GFP 細胞は HeLaT4/LTR-GFP 細胞より 10 倍以上 HIV-1 感染検出感度が高かった。

D. 考察

我々が作成した indicator cell line は、CCR5、CXCR4 をコレセプターとして使用する HIV-1、HIV-2、および SIV のコレセプター使用能に特異的な感染を 48 時間後に検出が可能であ

る。また、HIV/SIV 感染により細胞核内で発現誘導される GFP を指標とすることで感染細胞を生きのまま経時的に観察することが可能である。感染を検出するために細胞の固定や薬剤処理の必要がないので簡便である。

E. 結論

我々が作成した indicator cell は、HIV/SIV の感染を迅速に検出することが可能であり、HIV/SIV 感染や病態発現機構の解明だけでなく、GPCR のリガンドの探索や同定にも応用できる可能性がある。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Tamura K, Oue A, Tanaka A, Shimizu N, Takagi H, Kato N, Morikawa A, and Hoshino H. Efficient formation of vesicular stomatitis virus pseudotypes bearing the native forms of hepatitis C virus envelope proteins detected after sonication. *Microbes Infect.* 2005, 7: 29-40.

2) Shimizu A, Shimizu N, Tanaka A, Jinno-Oue A, Roy BB, Shinagawa M, Ishikawa O, and Hoshino H. Human T-cell leukaemia virus type I is highly sensitive to UV-C light. *J. Gen. Virol.* 2004. 85:2397-406.

2. 学会発表

① Shimizu N, Tanaka A, Oue A, Takebe Y, and Hoshino H. G protein-coupled receptors, CCR9B, D6, FML1, and XCR1, have capacity to mediate the CD4-dependent infection of HIV-1, HIV-2, and SIV as coreceptors. XV International AIDS Conference, Bangkok, 11-16 July, 2004

② Jinno-Oue A, Shimizu N, Soda Y, Tanaka A, Ohtsuki T, Kurosaki D, and Hoshino H. Inhibition of HIV-1 infection by the synthetic ppeptide derived from the NH₂-terminal extracellular region of an orphan G protein-coupled receptor, GPR1. XV International AIDS Conference, Bangkok, 11-16 July, 2004

③ 大上厚志、清水宣明、田中 淳、星野洪郎. ヒト脳微小血管由来周皮細胞に指向性の HIV-1 変異株の利用する coreceptor, GPR1 のアミノ末端側合成ペプチドによる多様な HIV-1 株の感染抑制; 第 8 回日本神経ウイルス研究会 (札幌). 2004 年 6 月 11-12 日

④ 田中 淳、清水宣明、品川雅彦、大上厚志、星野洪郎. ヒト T 細胞白血病ウイルス I 型 (HTLV-I) 感染を促進する細胞膜蛋白について; 第 8 回日本神経ウイルス研究会 (札幌). 2004 年 6 月 11-12 日

⑤ 清水宣明、田中 淳、園田美奈、大上厚志、武部 豊、草川 茂、星野洪郎. ケモカイン・レセプター D6, 及びフォルミルペプチド・レセプター FML1 の HIV-1 コレセプター活性の解析; 第 52 回日本ウイルス学会学術集会 (横浜). 2004 年 11 月 21-23 日

⑥ 田中 淳、清水宣明、大上厚志、品川雅彦、星野洪郎. ヒト T 細胞白血病ウイルス I 型 (HTLV-I) 感染を促進する細胞膜蛋白について; 第 52 回日本ウイルス学会学術集会 (横浜). 2004 年 11 月 21-23 日

⑦ 田村一志、大上厚志、清水宣明、加藤宣之、星野洪郎. Native form の HCV をもつ VSV pseudotype virus の作製、およびその感染性についての検討; 第 52 回日本ウイルス学会学術集会 (横浜). 2004 年 11 月 21-23 日

⑧ 清水宣明、田中 淳、園田美奈、大上厚

志、星野洪郎. HIV-1 との相互作用に
関与する GPR1 の N 末端側細胞外領域の
アミノ酸配列の解析; 第 18 回日本エイズ
学会学術集会 (静岡). 2004 年 12 月 9-11 日

⑨大槻貴博、清水宣明、大上厚志、巽正志、
星野洪郎. GPR1 をコレセプターとして
使用する HIV-1 株の感染を検出する細胞株
の作製; 第 18 回日本エイズ学会学術集会
(静岡). 2004 年 12 月 9-11 日

⑩大上厚志、清水宣明、田中 淳、大槻貴博、
星野洪郎. HIV-1 変異株の利用する coreceptor,
GPR1, のアミノ末端側合成ペプチドによる
多様な HIV-1 株の感染抑制; 第 18 回日本
エイズ学会学術集会 (静岡). 2004 年 12 月
9-11 日

⑪藤 秀義、田中真理、宮内浩典、松田善衛、
星野忠次、有吉紅也、星野洪郎、佐藤裕徳、
横幕能行. HIV-1env クローニングライブラリー
作成の試み—HIV-1env の迅速なクローニング、
発現および組み換えウイルス作成システムの
構築—; 第 18 回日本エイズ学会学術集会
(静岡). 2004 年 12 月 9-11 日

G. 知的所有権の取得状況

「HIV-1 の感染を抑制するポリペプチド」
で特許取得済み

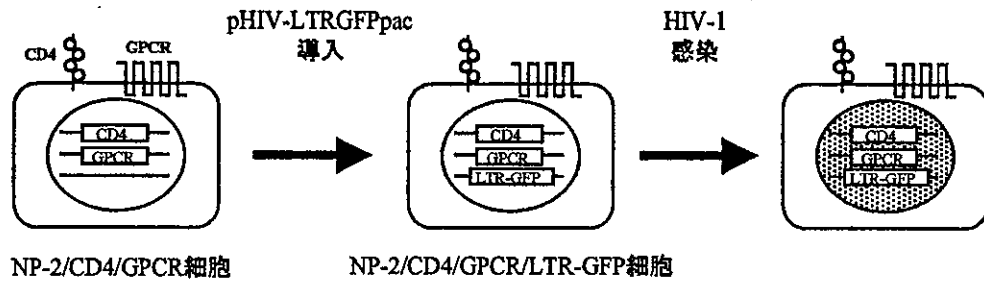


図1 NP-2/CD4/GPCR/LTR-GFP細胞の作製

NP-2/CD4/CCR5細胞およびNP-2/CD4/CXCR4細胞にpHIV-LTRGFPpacプラスミドを導入後、GFP低発現細胞をクローニングしてHIV-1を感染させた。感染によりGFP発現が誘導された細胞を3度クローニングを繰り返して、NP-2/CD4/CCR5/LTR-GFP細胞(N4R5/GFP)とNP-2/CD4/CXCR4/LTR-GFP細胞(N4X4/GFP)を樹立した。

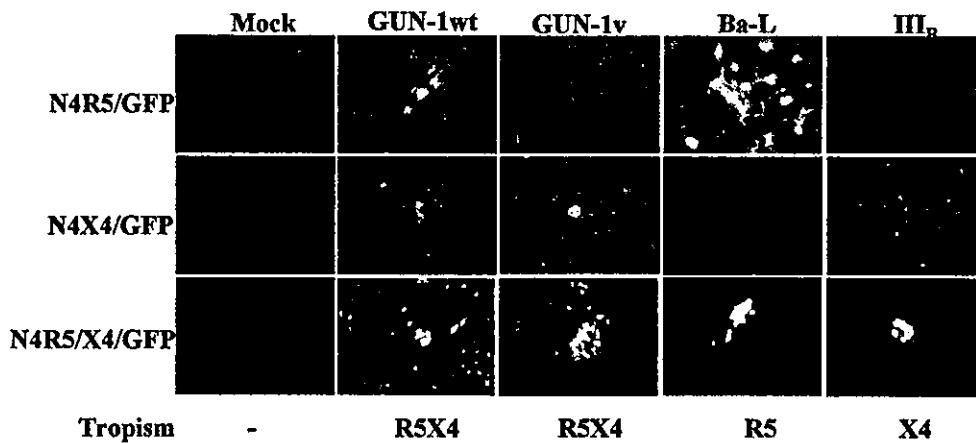
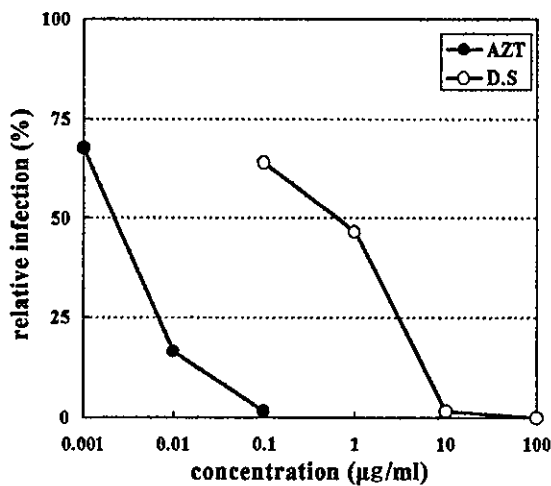


図2 HIV-1のコレセプター利用能に依存した感染特異的GFP発現誘導

Indicator cellを96穴プレートに播種し、24時間後に逆転写酵素活性で300cpm分のHIV-1を感染させた。感染48時間後に蛍光顕微鏡下でGFP発現細胞を観察した。



Drug	(μg/ml)	
	IC ₅₀	IC ₉₀
AZT	0.002	0.027
Dextran sulfate	0.6	3.8

図3 抗ウイルス剤による感染阻害効果の定量

N4R5/GFP細胞を96穴プレートに播種し、24時間後に希釈した薬剤を50 μl添加してGUN-1wt株を 3×10^2 IU/50 μlで感染させた。感染48時間後、蛍光顕微鏡下でGFP発現細胞数を測定し、IC₅₀とIC₉₀を算出した。GFP発現細胞数は、薬剤濃度依存的に減少した。

研究成果の刊行に関する一覧表

課題番号	H16-創薬-008
氏名	棚元憲一

著者（発表者）氏名 論文タイトル名 発表誌名 巻号，ページ，出版年

- 1) Yagyu F., Okitsu S., Tanamoto K. & Ushijima H. Determination of HIV-1 subtypes (A-D, F, G, CRF01_AE) by PCR with novel designed primers. J. Med virol. 2005
- 2) Hatao F, Hiki N, Mimura Y, Ogawa T, Kojima J, Mafune K, Hawkins LD, Muroi M, Tanamoto K, Kaminishi M. The induction of super-resistance using synthetic lipopolysaccharide receptor agonist rescues fatal endotoxemia in rats without excessive immunosuppression. Shock. 23, 365-370, 2005.
- 3) Kawamura Y., Mutsuga M., Kato T., Iida M. and Tanamoto K. Estrogenic and anti-androgenic activities of benzophenones tested by the human estrogen and androgen receptor mediated receptor gene assays. J.Health Sci, 51, 48-54, 2005
- 4) Mutsuga M., Tojima T., Kawamura Y. & Tanamoto K. Determination of formaldehyde, acetaldehyde and pigments in PET food packaging. Food. Addit. Contam. 2004
- 5) Sato S., Uematsu Y., Isagawa S., Tateba H., Tomisawa M., Oosaki K., Hasebe A., Shibuya S., Nii H., Higashinaka R., Watanabe I., Yamazaki S., Tanamoto K. & Maitani T. Analysis of residual solvents in natural flavourings by headspace GC using the standard addition method. J. Food Hyg. So. 45, 302-306, 2004
- 6) Yashiro T., Sugimoto N., Sato K., Yamazaki T. & Tanamoto K. Analysis of Absintin in Absinth extract bittering agent. Jpn. J. Food Chem. 11, 86-90, 2004
- 7) Kikuchi Y., Kakeya T., Sakai A, Takatori K., Nakamura N., Matsuda H., Yamazaki T., Tanamoto K. & Sawada J. In vitro propagation of a sporadic CJD-like form of PrP^{sc} in long-term cultured human glioblastoma cell line T98G. J. gen. Virol. 85, 3449-3457, 2004
- 8) Hatao H., Muroi M., Hiki N., Ogawa T., Mimura Y., Kaminishi M & Tanamoto K. Prolonged Toll-like receptor stimulation leads to down-regulation of IRAK-4 protein. L. Leukocyte Biol. 2004
- 9) Iso A., Sugimoto N., Sato K., Yamazaki T., Ishibashi K., Shiomi S. & Tanamoto K. Identification of Alo extract, a natural thickening stabilizer. J. Food Hyg. Soc. Japan, 44(6), 328-3331, 2004
- 10) Hong C-C., Shimizu M., Muroi M. & Tanamoto K. Effects of endocrine disrupting chemicals on lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor- and nitric oxide production by mouse macrophages. Biol. Pharm. Bull. 27(7), 1136-1139, 2004
- 11) Kubota H., Ohnishi Y., Yomota C. & Tanamoto K. Analysis of ferrocyanides in grade salts. Jpn. J. Food Chem. 11, 32-35, 2004
- 12) Abe-Onishi, Y., Yomota, C., Sugimoto, N., Kubota, H. & Tanamoto, K. Determination of benzoyl peroxide and benzoic acid in wheat flour by high performance liquid chromatography and its identification by high-performance liquid chromatography-mass spectrometry. J. Chromatogr. A, 1040, 211-216, 2004
- 13) Ohkado Y., kawamura Y., Mutsuga M., Tamura H & Tanamoto K. Analysis of Residual volatiles in recycled polyethylene terephthalate. J. Food Hyg. Soc. Japan, 45, 13-20, 2005.
- 14) Tamura K, Oue A, Tanaka A, Shimizu N, Takagi H, Kato N, Morikawa A, and Hoshino H. Efficient formation of vesicular stomatitis virus pseudotypes bearing the native forms of hepatitis C virus envelope proteins detected after sonication. Microbes Infect. 2005, 7: 29-40.

- 15) Shimizu A, Shimizu N, Tanaka A, Jinno-Oue A, Roy BB, Shinagawa M, Ishikawa O, and Hoshino H. Human T-cell leukaemia virus type I is highly sensitive to UV-C light. *J. Gen. Virol.* 2004. 85:2397-406.
- 16) H. Nagai, K. Wada, T. Morishita, M. Utsumi, Y. Nishiyama and T. Kaneda. New estimation method for highly sensitive quantitation of Human Immunodeficiency Virus Type 1 DNA and its application. *J. Virol. Methods*, in press.
- 17) Yagyu F, et al. Determination of HIV-1 subtypes (A, B, C, D, G, CRF01_AE) by PCR in the transmembrane region (gp41) with novel primers. *J Med Virol* In press
- 18) Phan TG, et al. Etiologic agents of acute gastroenteritis among Japanese infants and children: virus diversity and genetic analysis of sapovirus. *Arch Virol* In press
- 19) Hansman GS, et al. Characterization of polyclonal antibodies raised against five virus-like particles. *Arch Virol* In press
- 20) Oka T, et al. Proteolytic processing of sapovirus ORF1 polyprotein. *J Virol* In press
- 21) Phan TG, et al. A novel RT-multiplex PCR for enteroviruses, hepatitis A and E viruses and influenza A virus among infants and children with diarrhea in Vietnam. *Arch Virol* In press
- 22) Li L, et al. Molecular Epidemiology of Adenovirus Infection among Pediatric Population with Diarrhea in Asia. *Microbiol Immunol* 49(2):121-128, 2005
- 23) Phan TG, et al. Genetic diversity of sapovirus in fecal specimens from infants and children with acute gastroenteritis in Pakistan. *Arch Virol* 150(2):371-377, 2005
- 24) Yan H, et al. Outbreak of acute gastroenteritis associated with group A rotavirus and genogroup I sapovirus among adults in a mental health care facility in Japan. *J Med Virol* 75(3):475-481, 2005
- 25) Hansman GS, et al. Viral gastroenteritis in Mongolian infants. *Emerg Infect Dis* 11(1): 180-182, 2005
- 26) Hansman GS, et al. Cross-reactivity among sapovirus recombinant capsid proteins. *Arch Virol* 150(1):21-36, 2005
- 27) Li L, et al. Characterizations of adenovirus type 41 isolates from children with acute gastroenteritis in Japan, Vietnam, and Korea. *J Clin Microbiol* 42(9):4032-4039, 2004
- 28) Phan TG, et al. Virus diversity and an outbreak of group C rotavirus among infants and children with diarrhea in Maizuru city, Japan during 2002-2003. *J Med Virol* 74(1):173-179, 2004
- 29) Yan H, et al. Development of RT-multiplex PCR assay for detection of adenovirus and group A and C rotaviruses in diarrheal fecal specimens for children in China. *Kansenshogakuzasshi* 78(8):699-709, 2004
- 30) Hansman GS, et al. Detection of norovirus and sapovirus infection among children with gastroenteritis in Ho Chi Minh City, Vietnam. *Arch Virol* 149(9):1673-1688, 2004
- 31) Phan TG, et al. Human astrovirus, norovirus (GI, GII), and sapovirus infections in Pakistani children with diarrhea. *J Med Virol* 73(2):256-261, 2004
- 32) Okitsu-Negishi S, et al. Molecular epidemiology of viral gastroenteritis in Asia. *Pediatr Int* 46(2):245-252, 2004
- 33) Ushijima H and Eshita Y. Foreword: Molecular epidemiology of viral infection in Asia. *Pediatr Int* 46(2):202-206, 2004
- 34) Sakamoto T, et al. Establishment of an HIV cell-cell fusion assay by using two genetically modified HeLa cell lines and receptor gene. *J Virol Methods* 114:159-166, 2004
- 35) Hansman GS. Genetic diversity of Norovirus and Sapovirus in hospitalized infants with sporadic cases of acute gastroenteritis in Chiang Mai, Thailand. *J Clin Microbiol* 42:1305-1307, 2004
- 36) Adhikary AK, et al. Characterization of hexon and fiber genes of a novel strain of adenovirus involved in epidemic keratoconjunctivitis. *J Clin Pathol* 57:95-97, 2004

- 37) Tran TTH, et al. Genotypic C of hepatitis B virus can be classified into at least two subgroups. *J Gen Virol* 85 :283-292, 2004
- 38) Tran TTH, et al. Characteristics of core promoter and precore stop codon mutants of hepatitis B virus in Vietnam. *J Med Virol* 74:228-236, 2004
- 39) Urata H, Kumashiro T, Kawahata T, Otake T, Akagi M, Anti-HIV-1 activity and mode of action of mirror image oligodeoxynucleotide analogue of zintevir, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 313, 55-61, 2004
- 40) 森 治代、小島洋子、川畑拓也、大竹 徹、巽 正志、コレセプター阻害剤を用いた R5/X4 ウイルス測定法、*MINOPHAGEN MEDICAL REVIEW* vol.49, 81-82, 2004
- 41) Dan Turner, Bluma Brenner, Daniela Moisi, Mervi Detorio, Raymond Cesaire, Takashi Kurimura, Haruyo Mori, Max Essex, Shlomo Maayan and Mark A. Wainberg, Nucleotide and Amino Acid Polymorphisms at Drug Resistance Sites in Non-B-Subtype Variants of Human Immunodeficiency Virus Type 1, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48, 2993-2998, 2004
- 42) 大竹 徹、ウイルスの高圧不活化と血液製剤への利用、*FFI ジャーナル*、210(1)、44-48、2005