

日目に軽度の発熱が認められた。HSV に対する抗体価の上昇は認められなかった。切除した腫瘍の病理学的検索の結果、1)広範な癌細胞の死滅が認められる、2)頭頸部癌（扁平上皮癌）では、乳癌（腺癌）の場合と異なり、核の消失が特徴的所見として認められる、3)CD4,CD8 陽性のリンパ球の浸潤が HF10 接種腫瘍内に顕著に誘導されることがわかった。

## 2) HF10 ゲノムの全塩基配列の決定

以前報告したように、HF10 は L 領域の両端に 2.30kb、3.83kb の欠損があり、その結果として UL56 及び Latency-associated transcripts(LAT)は発現されない。全塩基配列を決定した結果、HF10 では frame-shift により UL55、UL43、UL49.5 遺伝子産物の発現が欠失することが明らかになった。また、replication-origin(oriL)がほぼ完全に欠失していることも示された。さらに HF10 の細胞融合能を説明する数カ所の変異が明らかになった。

## 3) アンプリコンによる抗腫瘍作用の増強

抗腫瘍作用の増強のためにアンプリコンを利用する場合には、HF10 のような弱毒化抗腫瘍性 HSV をヘルパーとして用いれば、感染性ウイルスを除く必要は必ずしもない。CMV プロモーターの下流にマウス GM-CSF 遺伝子を組み込んだアンプリコンプラスミドを作製し、ヘルパーウイルスとして HF10 を用いてアンプリコン化した。CT26 マウス大腸癌由来細胞/BALB/C マウスの固形腫瘍モデル系における検討において、GM-CSF アンプリコンを含む HF10 投与は HF10 単独に比べ有意に強い抗腫瘍作用を示した。また、アンプリコンを含むものは明らかに強い単球系細胞の浸潤が認められた。

## 4) HF10 と GCV の combination therapy における bystander effect の機構

我々は以前、hrR3 と hrR3 由来の変異株を用いた動物実験において、これらのウイルス接種と GCV の投与をうまく組み合わせれば、ウイルスの抗腫瘍作用が増強することを報告してきた。一方、HSV TK を発現する腫瘍細胞においては、GCV の投与によ

る直接的細胞傷害作用に加えて、周辺の TK 非発現細胞を傷害する bystander 作用が知られている。しかし、増殖型ウイルスと GCV の組み合わせによる増強作用は欧米のグループからは報告されていない。そこで、増殖型ウイルス HF10 と GCV 処理がどのような変化を細胞に与えるのかを培養細胞系 (Hep2) において検討した。その結果、ある条件下では増殖型ウイルスの感染細胞においても GCV 処理による bystander 作用が現れることが明らかになった。また、その条件下では gap junction の主要構成蛋白質コネキシン 43 の産生が増強されることがわかった。

## D. 考察

HF10 を用いた臨床試験の結果から、ヒト (HSV 抗体陽性) の腫瘍内において HF10 が比較的長期 (2 週間以上) にわたり増殖し、癌細胞を死滅させながら存続しうることが示された。また、マウスで使用する 1/100 のウイルス量で広範な腫瘍細胞の死滅を引き起こすことがわかった。HF10 は Immuno competent マウスを用いたモデル系では速やかにクリアランスを受けるので、有効性、そして安全性予測には、ヌードマウスモデル系、培養細胞レベルでの検討を含め総合的な判断が必要である。

## E. 結論

再発性乳癌や頭頸部癌に対するトランスレショナルリサーチは、HF10 の高い抗腫瘍作用と安全性を示唆し、Oncolytic viral therapy の将来性を強く期待させるものであった。現在、英国にて GMP 製剤の製造が進められており、今年中に GLP での前臨床試験を経て、来年度初頭には本格的な臨床試験に入る予定である。

## F. 健康危険情報

特になし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Nishimura, N., Yoshikawa, T., Ozaki, T., Sun, H., Goshima, F., Nishiyama, Y., Asano, Y., Kurata, T and Iwasaki, T.: In vitro and in vitro analysis of human herpes -6 U90 protein expression. *J. Med. Virol.* 75: 86-92, 2005.
2. Yamamoto, K., Yoshikawa, T., Okamoto, S., Yamaki, K., Shimokata, K. and Nishiyama, Y.: HHV-6 and 7 DNA loads in lung tissues collected from patients with interstitial pneumonia. *J. Med. Virol.* 75: 70-75, 2005.
3. Nagai, H., Wada K., Morishita, T., Utsumi, M., Nishiyama, Y. and Kaneda, T.: New estimation method for highly sensitive quantitation of human immunodeficiency virus type 1 DNA and its application. *J. Virol. Methods* 124: 157-165, 2005.
4. Koshizuka, T., Kawaguchi, Y. and Nishiyama, Y.: Herpes simplex virus type 2 membrane protein UL56 associates with the kinesin motor protein KIFIA. *J. Gen. Virol.* 86: 527-533, 2005.
5. Enomoto, Y., Yoshikawa, T., Ihira, M., Akimoto, S., Miyake F., Usui, C., Suga, S., Suzuki, K., Kawana T., Nishiyama, Y. and Asano, Y.: Rapid Diagnosis of herpes simplex virus infection by a loop-mediated isothermal amplification method. *J. Clin. Microbiol.* 43: 951-955, 2005.
6. Kudoh, A., Fujita, M., Zhan, L., Shirata, N., Daikoku, T., Sugaya, Y., Isomura, H., Nishiyama, Y. and Turumi, T.: Epstein-Barr virus lytic replication elicits ATM checkpoint signal transduction while providing an S-phase-like cellular environment. *J. Biol. Chem.* 280: 8156-8163, 2005.
7. Mori, I., Nishiyama, Y., Yokochi, T. and Kimura, Y.: Olfactory transmission of neurotropic viruses. *J. Neurovirol.* 11: 129-137, 2005.
8. Mori, I., Goshima, F., Ito, H., Koide, N., Yoshida, T., Yokochi, T., Kimura, Y. and Nishiyama, Y.: The vomeronasal chemosensory system as a potent route of neuroinvasion by herpes simplex virus. *Virology* 334: 51-58, 2005.
9. Mori, I., Koshizuka, T., Goshima, F., Ito, H., Koide, N., Yoshida, T., Yokochi, T., Kimura, Y. and Nishiyama, Y.: Herpes simplex virus US11 shows intercellular trafficking activity in the mouse brain. *Mol. Brain Res.* 136: 158-163, 2005.
10. Nozawa, N., Kawaguchi, Y., Tanaka, M., Kato, A., Kato, A., Kimura, H. and Nishiyama, Y.: Herpes simplex virus type 1 UL51 protein is involved in maturation and egress of virus particles. *J. Virol.* 79: 6947-6956, 2005.
11. Kato, A., Yamamoto, M., Ohno, T., Kodaira, H., Nishiyama, Y. and Kawaguchi, Y.: Identification of proteins phosphorylated directly by the US3 protein kinase encoded by herpes simplex virus 1. *J. Virol.* 79: 9325-9331, 2005.
12. Shaku, F., Matsuda, G., Furuya, R., Kamagata, C., Igarashi, M., Tanaka, M., Kanamori, M., Nishiyama, Y., Yamamoto, N. and Kawaguchi, Y.: Development of a monoclonal antibody against Epstein-Barr virus nuclear anti gen leader protein (EBNA-LP) that can detect EBNA-LP expressed in P3HR1 cells. *Microbiol. Immunol.* 49: 477-483, 2005.
13. Matsuzaki, A., Yamauchi, Y., Kato, A., Goshima, F., Kawaguchi, Y., Yoshikawa, T. and Nishiyama, Y. The US3 protein kinase of herpes simplex virus type 2 is required for the stability of the UL46-encoded tegument protein and its association with virus particles. *J. Gen. Virol.* 86: 1979-1985, 2005.
14. Mori, I., Liu, B., Goshima, F., Ito, H., Koide, N., Yoshida, T., Yokochi, T., Kimura Y. and Nishiyama, Y.: HF10, an attenuated herpes simplex virus (HSV) type 1 clone, lacks neuroinvasiveness and protects mice against lethal challenge with HSV types 1 and 2. *Microb. Infec.* 7: 1492-1500, 2005.
15. Mori I, Nishiyama Y.: Herpes simplex virus and varicella-zoster virus: why do these human alphaherpesviruses behave so differently from one another? *Rev. Med. Virol.* 15: 393-406, 2005.
16. Kohno, S., Luo, C., Goshima, F., Nishiyama, Y., Sata, T. and Ono, Y.: Herpes simplex virus type 1 mutant HF10 oncolytic viruthery for bladder cancer. *Urology* 66: 1116-1121, 2005.
17. Tanaka, M., Nishiyama, Y., Sata, T. and Kawaguchi, Y.: The role of protein kinase activity expressed by the UL13 gene of herpes simplex virus 1: the activity is not essential for optimal expression of ICP0 and UL41. *Virology* 341: 301-312, 2005.
18. Mori, I., Goshima, F., Mizuno, T., Imai, Y., Kohsaka, S., Ito, H., Koide, N., Yoshida, T., Kimura, Y., Yokochi, T. and Nishiyama, Y.: Axonal injury in experimental herpes simplex encephalitis. *Brain Res.* 1057: 186-190, 2005.
19. Miyake, F., Yoshikawa, T., Sun, H., Kakimi, A., Ohashi, M., Akimoto, S., Nishiyama, Y., Asano,

- Y. Latent infection of human herpesvirus 7 in CD4(+)T lymphocytes. *J. Med. Virol.* 78: 112-116, 2005.
20. Kato, A., Yamamoto, M., Ohno, T., Tanaka, M., Sata, T., Nishiyama, Y., and Kawaguchi, Y.: Herpes simplex virus 1-encoded protein kinase UL13 phosphorylates the viral US3 protein kinase and regulates nuclear localization of viral envelopment factors UL34 and UL31. *J. Virol.* 80: 1476-1486, 2006.
  21. Koshizuka, T., Kawaguchi, Y., Goshima, F., Mori, I. and Nishiyama, Y.: Association of two membrane proteins encoded by herpes simplex virus type 2, UL11 and UL56. *Virus Genes*, in press.
  22. Mori, I. and Nishiyama, Y.: Replication-competent herpes simplex virus: a novel and promising modality for cancer therapy. *Curr. Topics Virol.*, in press.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

## 4. ヒトヘルペスウイルス(HHV-)6、HHV-7 を利用したベクターの安全性評価

分担研究者 近藤 一博 (東京慈恵会医科大学微生物学講座第1 教授)

研究協力者 鎌田 美乃里、嶋田 和也、船水 尚武、清水 昭宏  
(東京慈恵会医科大学微生物学講座第1)

**研究要旨** ヒトヘルペスウイルス (HHV-) 6 と HHV-7 を利用した遺伝子治療用ベクターは、病原性が低く、リンパ球系の細胞に比較的大きな遺伝子を導入できる。ウイルス蛋白の発現が低く一生涯保持される潜伏感染状態を利用することにより、安全で長期的な遺伝子発現を得る事も可能である。また、HHV-6、HHV-7 を利用したベクターは、世界に先駆けて開発したものであるため、本邦の知的財産確保にも寄与できると考えられる。今年度は、HHV-6 や HHV-7 を基礎としたウイルスベクターの感染様式を検討するための小動物感染実験モデルを、NOD-SCID-hu マウスを用いて作成した。このモデルでは、ヒトの場合に比べて  $10^2 \sim 10^3$  高率に HHV-6 の潜伏感染が観察され、HHV-6 の潜伏感染の機序や病原性をより感度良く観察できる系である事が示唆された。また、この系を用いる事により U2-U8 領域の遺伝子がウイルス増殖に必要であるが潜伏感染自体には関係しない事が確認されるなど、遺伝子機能の解析に有用である事も示された。さらに、ウイルス増殖のレポーターとなる 2 つのクラスに分類される初期遺伝子プロモーターを同定し、ウイルスの増殖感染を細胞の生存状態で可視化する方法も開発した。

### A. 研究目的

本研究は、我々が世界に先駆けて開発した HHV-6、HHV-7 を利用した遺伝子治療用ベクターにおいて、病原遺伝子の同定と除去、潜伏感染の利用と安全性の評価、組織特異性の強化を行なうことによって、できる限り安全なベクターの作成し、その安全性の確認と有効な治療法の開発をおこなう事を目的とする。

HHV-6、HHV-7 は、もともと病原性が低いウイルスである上に、潜伏感染状態での遺伝子発現も利用できるため、ベクターも安全性が高い事が期待される。昨年度までの研究により、HHV-6 の増殖に必要な遺伝子は細胞ごとにかなり異なっており、少しの遺伝子変化を導入するだけで、細胞特異性を変化させられることが示唆された。また、特殊な細胞の条件でないと増殖が出来ない growth defective virus が容易

に作成できる事も明らかになってきた。また、HHV-6、HHV-7 は、CD4 陽性 T 細胞、ナチュラルキラー細胞、マクロファージなどの他種類の免疫担当細胞に非常に高率に遺伝子導入可能である事が判明した。

今年度は、HHV-6 および HHV-7 の潜伏感染、持続感染、増殖感染などの様々な感染様式を支持する細胞の種類や分化段階を詳細に検討するための感染モデル動物の作成と、この感染モデルを用いた in vivo での遺伝子機能解析、このモデル動物を用いた感染実験系におけるウイルス感染状態の可視化をおこなうためのレポーターの開発を主な目的として研究を行なった。

### B. 研究方法

1) HHV-6、HHV-7 の感染モデル動物の作成:

ウイルスベクターの有効性及び安全性の評価には、ウイルスベクターの基となる HHV-6、HHV-7 の感染モデルを作成し、遺伝子操作による感染の変化を検討することが重要となる。ところが HHV-6 はヒトとサルにのみ、HHV-7 はヒトのみ感染するため、小動物を使用した実験系を作成することは難しかった。

これを解決するために SCID-hu マウスを用いた感染系を作成することとした。SCID-hu マウスはこれまでに様々なタイプのもものが報告され、各々主として維持される細胞の種類が異なる。今回我々は、ヘルペスウイルスの病原性の重要な因子である潜伏感染・再活性化と持続感染に関する研究を主として行なうために、HHV-6 と HHV-7 の潜伏感染・再活性化を支持すると考えられる myeloid 系細胞の分化・増殖を維持できる NOD-SCID-hu マウスを選択した。

NOD-SCID-hu マウスは、NOD-SCID マウスにヒト臍帯血由来単核球を移入して作成した。臍帯血移入 6 週間後に末梢血を部分採血し、抗ヒト CD45 抗体にてヒト骨髄細胞の再構成を確認した。ウイルス感染は、HHV-6 または HHV-7 を phytohemagglutinin (PHA) 刺激したヒト臍帯血由来 T 細胞に感染したものを尾静脈から移入することによって行なった。感染 4~6 週後に SCID-hu マウスの骨髄、脾臓、末梢血を採取し、感染状態の検討を行なった。

なお、臍帯血の採取に関しては、インフォームドコンセントを取るに当たり、厚生労働省のガイドラインに準拠した同意書を作成し、これに患者またはこれに代わる親権者の同意を得た。全ての研究の過程は東京慈恵会医科大学・倫理委員会の承認を得たプロトコルにしたがって行われた。

## 2) HHV-6 の感染状態の検討:

上記の方法で HHV-6 を感染させた SCID-hu マウスの感染状態の検討を以下の方法で行なった(HHV-7 に関しては検討が不十分であるため、ここでは主として HHV-6 に関して記載する)。

### ① HHV-6 の感染率の検討

HHV-6 感染細胞の比率を求めるために、感染細胞を破壊することなく骨髄、脾臓を mince、分散させ、希釈系列を作成し、ウイル

ス DNA の存在を double-nested PCR 法で測定した後、Reed-Muench 法にて計算した。

### ② HHV-6 の感染様式の検討

HHV-6 の感染状態が潜伏感染状態であるか増殖感染(再活性化、持続感染含む)であるかを検討するために感染細胞を破壊することなく骨髄、脾臓を mince、分散させ、希釈系列を作成したものから total RNA を精製した。精製した RNA は、ランダムプライマーにて逆転写反応を行なった後、HHV-6 の潜伏感染関連遺伝子、前初期遺伝子、初期遺伝子、後期遺伝子にそれぞれ特異的なプライマーを用いて、double-nested RT-PCR を行なった。

### 3) SCID-hu マウスモデルを用いた HHV-6 遺伝子機能の解析:

上記 1)、2) の研究の結果、上記の NOD-SCID-hu マウスは、HHV-6 の潜伏感染・再活性化と持続感染に関する非常に良いモデルである事が判明した(後述)。

そこで、この系を用いて growth defective な H6R28 の潜伏感染に関する検討を行い、KO されている U2~U8 領域の遺伝子の潜伏感染に対する影響を in vivo で検討した。感染状態の把握は、上記 2) の方法によって行なった。また、SCID-hu マウスの骨髄相棒および脾臓細胞を、PHA 刺激したヒト臍帯血由来 T 細胞と混合培養を行なうことにより、H6R28 の増殖感染が生じているかどうかも検討した。

### 4) HHV-6、HHV-7 の感染様式を可視化 可視化できるレポーターの開発:

HHV-6 および HHV-7 をもとにした遺伝子治療用ベクターを使用する際には、これらのウイルスが潜伏感染または流産感染状態で、ウイルス増殖が行なわれない事が望ましい。昨年までに我々は、HHV-6 の U2~U8 領域を knock out (KO) した組み換えウイルス H6R28 は、phytohemagglutinin (PHA) 刺激したヒト臍帯血由来 CD4 陽性 T 細胞や Molt-3 細胞では良好な増殖を示すが、通常の培養条件での末梢血由来 CD4 陽性 T 細胞や、wild type (wt) の HHV-6 が良好な増殖を示す MT-4 細胞でのウイルス増殖は著しく抑制されていることを見出した。また、同時に我々は、このような growth defect を生じさせる原因遺伝子として U875 遺伝子を同定した(第 52 回日本ウイルス学会にて報告)。このため、H6R28

は病原性が wt ウイルスよりも低い事が予測され、遺伝子治療用ベクターとして有用であると考えられる。

ウイルスベクターの安全性を向上させるためには、U875 遺伝子以外にもウイルスの増殖を制御できる遺伝子欠損を見出す事が重要である。H6R28 では、感染のマーカー遺伝子である enhanced green fluorescent protein (EGFP) 遺伝子のプロモーターとしてヒトサイトメガロウイルス (HCMV) major immediate early promoter を使用している。このため、潜伏感染での EGFP 発現は抑制されているが、流産感染では EGFP が発現してしまいために流産感染と増殖感染を区別することができない。

今回はこの問題を解決するために、潜伏感染、流産感染ともに遺伝子発現が抑制され、増殖感染のみで遺伝子が発現するウイルスエンハンサー・プロモーターの同定を行なった。具体的な実験は、以下の方法で行なった。

- ①ヘルペスウイルスの増殖開始初期に発現する初期遺伝子のエンハンサー・プロモーター部位を、Kozak ATG サイトから上流約 1 Kbp を PCR 法で増幅することによりクローニングした。初期遺伝子としては、U79/80 遺伝子、U41 遺伝子、p41 遺伝子、DNA ポリメラーゼ遺伝子を検討した。
- ②クローニングした初期遺伝子エンハンサー・プロモーターをルシフェラーゼ遺伝子上流に組みこみ、HeLa 細胞、293T 細胞、MT-4 細胞にトランスフェクションした。各々の細胞に HHV-6 感染または IE1、IE2 などの前初期遺伝子を発現させる事によって初期遺伝子エンハンサー・プロモーターを刺激し、エンハンサー・プロモーターの活性化の度合いを計測した。さらに、初期遺伝子エンハンサー・プロモーター部分に欠損を加えたものを作成することにより、エンハンサー・プロモーターの活性に重要な部分を同定した。
- ③得られたエンハンサー・プロモーター下流に EGFP を組み込んだ遺伝子を HHV-6 の U2~U8 領域を KO して組み込み、U2-U8 KO ウイルスが増殖可能な細胞とそれ以外の細胞における EGFP 発現を検討し、増殖のマーカーとなる遺伝子を *in vivo* で確定する。

(倫理面への配慮)

遺伝子組換え実験は東京慈恵会医科大学・遺伝子組み換え委員会の承認の後、遺伝子組換え実験ガイドラインに沿って行なった。

## C. 研究結果

### 1) HHV-6、HHV-7 の感染モデル動物の作成:

HHV-6 を NOD-SCID-hu マウスに投与したところ、感染後 4 週間から 10 週間以上経過したマウスにおいても、HHV-6 DNA が検出された。コントロールのヒト細胞を移植していない NOD-SCID マウスでは 2 週間以内に感染させた HHV-6 の DNA が検出感度以下となった。

HHV-6 の感染状態を検討するために骨髄と脾臓における HHV-6 mRNA の発現を検討した。脾臓では HHV-6 の初期遺伝子 U79/80 や後期遺伝子 U60/66 が検出されるのに対し、骨髄ではこれらウイルス増殖の指標となる遺伝子の発現は検出されなかった。このことは、この感染モデル動物では脾臓において HHV-6 の持続的な増殖感染が、骨髄において HHV-6 の潜伏感染が成立している可能性を示すものであった。

NOD-SCID-hu マウスでは、骨髄に未分化 myeloid 系細胞が、脾臓により分化した myeloid 系細胞が存在することが知られている。また、HHV-6 が属する  $\beta$ -ヘルペスウイルスでは、幾つかの証拠から未分化細胞で潜伏感染しているウイルスが、細胞分化に伴って再活性化を生じると考えられており、上記の現象はこのことを証明する良い証拠となるものと考えられた。

HHV-6 の感染率を検討したところ、骨髄では  $4.8 \times 10^3$  ヒト細胞あたり 1 個、脾臓では  $3.5 \times 10^2$  ヒト細胞あたり 1 個という高い感染率が観察された。このうち、骨髄における感染は上記の結果より潜伏感染であると考えられる。通常のヒトにおける HHV-6 の潜伏感染では、ウイルス感染率は、 $10^6 \sim 10^7$  分の 1 程度であるため、この動物モデルは、通常のヒトに比して極めて多くの潜伏感染細胞を維持していることが示唆された。これらの結果より、この系は、HHV-6 の潜伏感染・再活性化と持続感染を非常に効率よく再現している系である事が示された。また、この感染モデルは、HHV-6 と近縁の HHV-7 の感染モデル

ルとしても同様に用いることができると考えられ、現在実験を進行中である。

## 2) SCID-hu マウスモデルを用いた HHV-6 遺伝子機能の解析

HHV-6 の U2~U8 領域を knock out (KO) した組み換えウイルス H6R28 を NOD-SCID-hu マウスに感染させた結果、感染 6 週間後でもウイルス DNA が検出された。また、細胞の段階希釈と double-nested PCR 法によってウイルス DNA を保持している細胞の存在率を検討したところ、wt ウイルス同様の非常に高い率でウイルス DNA 陽性細胞が NOD-SCID-hu マウスの骨髄と脾臓に存在することが判明した。また、初期遺伝子の発現も観察することが出来た。しかし、PHA 刺激したヒト臍帯血由来 T 細胞と混合培養を行ってもウイルス分離はできず、H6R28 の増殖を検出する事はできなかった。このことから、U2~U8 領域の遺伝子を KO することによりウイルスの増殖感染は *in vivo* で defective となるが、潜伏感染そのものは障害を受けないことが示唆された。

## 3) HHV-6、HHV-7 の感染様式を可視化 可視化できるレポーターの開発:

候補とした遺伝子のエンハンサー・プロモーターの性質を検討した結果、U79/80 遺伝子、U41 遺伝子、p41 遺伝子、DNA ポリメラーゼ遺伝子のエンハンサー・プロモーターは、細胞内因子では活性化されず、*in vitro* においても前初期での発現がないことが判った。また、このエンハンサー・プロモーターを活性化するウイルス因子を検討した結果、U79/80 遺伝子のエンハンサー・プロモーターは、コスミドライブラリーを用いたスクリーニングにより、HHV-6 前初期遺伝子で活性化される事が判明した。さらに、初期遺伝子の何れがもっとも強く U79/80 遺伝子を活性化するかを検討したところ、IE 1 は transactivator 活性が低く、IE 2 が最も強い transactivator 活性を持っていた。また、他の初期遺伝子のエンハンサー・プロモーターは、U79/80 エンハンサー・プロモーターとは異なり、前初期遺伝子のみでは活性化されないことが判明した。また、U79/80 遺伝子エンハンサー・プロモーター中に存在する活性化の cis エlement も同定できた。

これらの結果から、HHV-6 の増殖の指標とな

る初期遺伝子のエンハンサー・プロモーターには明らかに性質の異なる 2 つのクラスが存在することが示唆された。何れのエンハンサー・プロモーターがウイルス増殖の最も良い指標になるかは、U2-U8 KO ウイルスに組み込むことにより、*in vitro* と *in vivo* において検討する。

現在、HHV-7 におけるエンハンサー・プロモーター部位も、HHV-6 のとのホモロジーを利用して同定・クローニングを行い、HHV-6 と同様の方法で検討を行なっている。

## D. 考察

HHV-6 の感染モデルに関しては、これまでにサルに HHV-6 が感染することは報告されている。しかし、この系は簡単に使用することはできないので、本研究計画では最終的な安全確認にのみサルを使用し、サルを用いた実験に至る過程で使用できる小動物感染モデルが必要不可欠である。HHV-6 の小動物感染モデルに関しては、胎児の胸腺と肝臓を用いた SCID-hu Thy/Liv マウスの系が報告されているが、この系は 2 つの点で問題がある。一つは、本邦ではヒト胎児の研究目的での使用が難しく、SCID-hu Thy/Liv マウスが作成できない事、もう一つは、この系で維持できるのは T 細胞系の細胞に限られるために、HHV-6 の潜伏感染・再活性化などの病原性に深く関わる現象の検討ができない事である。

これらの欠陥を克服した小動物感染モデルを作成するために、我々はヒト臍帯血由来単核球をもちいて myeloid 系細胞の増殖・分化が維持できる NOD-SCID-hu マウスを利用して、HHV-6 の潜伏感染・再活性化と持続感染を同時に観察できる小動物感染モデルを作成することに成功した。HHV-7 は HHV-6 と非常に近縁なウイルスで、マクロファージなどの myeloid 系細胞で潜伏感染・再活性化を生じる事が予測されるため、HHV-7 に関してもこの系が有用なのではないかと我々は考えている。

この系は、ウイルスの潜伏感染・再活性化や増殖に関わる遺伝子の機能を *in vivo* において観察するのに非常に有用であると考えられる。実際に今回の実験では、U2~U8 領域を knock out した H6R28 ウイルスの潜伏感染自体は障害されていないが、ウイルス増殖に大きな障害がある事が *in vivo* においても確認された。

ウイルス遺伝子の感染様式に与える影響を検討するためには、ウイルスの感染状態を可視化できるレポーターがあると有用である。しかし、これまでに用いていたレポーターは HCMV major immediate early promoter の下流で EGFP を発現させるものであったので、ウイルスの増殖以外の条件でも EGFP 発現が見られる事があった。今回は、HHV-6 に関してウイルス増殖にのみ反応して EGFP を発現する遺伝子として初期遺伝子を数種類同定したが、これらの遺伝子は前初期遺伝子蛋白単独で活性化されるか否かによって、性質の異なる 2 つのクラスに大別されることが判明した。2 つのクラスのエンハンサー・プロモーターの内どちらが有用なのかに関しては、組み換えウイルスに組み込み、培養細胞や NOD-SCID-hu マウスシステムを用いて検討する必要があると考えられた。

## E. 結論

HHV-6 や HHV-7 を基礎としたウイルスベクターの感染様式を検討するための小動物感染実験モデルを、NOD-SCID-hu マウスを用いて作成することができた。このモデルでは、ヒトの場合に比べて  $10^2 \sim 10^3$  高率に HHV-6 の潜伏感染が観察され、HHV-6 の病原性をより感度良く観察できる系である事が示唆された。また、この系を用いる事により U2-U8 領域の遺伝子がウイルス増殖に必要であるが潜伏感染自体には関係しない事が確認されるなど、遺伝子機能の解析に有用である事も示された。さらに、ウイルス増殖のレポーターとなる初期遺伝子プロモーターを同定し、ウイルス感染様式を可視化する方法も開発した。

## F. 健康危険情報

特になし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. M. Takemoto, M. Koike, Y. Mori, S. Yonemoto, Y. Sasamoto, K. Kondo, Y. Uchiyama, K. Yamanishi. Human herpesvirus 6 open reading frame U14 protein and cellular p53 interact with each other and are contained in the virion. *J. Virol.* 2005;79(20), 13037-13046.
2. M. Urashima, M. Sakuma, S. Terumoto, Y. Fuyama, Y. Eto, K. Kondo, T. Tanaka. Gene expression profiles of peripheral blood and cord blood mononuclear cells altered by thymic stromal lymphopoietin. *Pediat. Res.* 2005;57(4), 563-569.

### 2. 学会発表

1. K. Kondo, M. Kamada, N. Funamizu, K. Shimada, M. Takemoto, and K. Yamanishi.: Application of human herpesvirus (HHV)-6 and HHV-7 for the gene therapy vectors. 12th International conference on immunology and prophylaxis of human herpesvirus infections (Oct. 2005 Osaka)
2. 鎌田美乃里, 近藤一博: Scid-hu マウスを用いた in vivo HHV-6 感染モデル動物作製の試み。第 53 回日本ウイルス学会 (2005 年 11 月、横浜)
3. 嶋田和也, 近藤一博: ヒトヘルペスウイルス 6 (HHV-6) U79/80 遺伝子のエンハンサー・プロモーター解析。第 53 回日本ウイルス学会 (2005 年 11 月、横浜)

## H. 知的財産権の出願・登録状況

特許申請中

「HHV-6 または HHV-7 由来の組み換えウイルスベクター、その製造方法、それを用いた宿主細胞の形質転換方法、それにより形質転換された宿主細胞およびそれを用いた遺伝子治療方法」

国際特許出願 PCT/JP2004/012487、国内出願 2003 年第 307335 号



## 5. 遺伝子治療用レトロウイルスベクターの 安全性評価に関する研究

分担研究者 北村 義浩（東京大学医科学研究所先端医療研究センター  
感染症分野助教授）

**研究要旨** 遺伝子治療において治療遺伝子を標的細胞に効率よく導入し安定的に維持させて当該遺伝子を発現させることが必要である。効率の良い安全なレンチウイルスベクターを確立するためにヒトへの病原性が低いレンチウイルスを利用することが考え、ネコ免疫不全ウイルス（FIV）に着目した。FIV の構造遺伝子を持たず 3'側の LTR 内の U3 領域に欠損を有する自己不活化ベクターの構造を作製した。FIV の構造遺伝子（gag と pol 遺伝子）を発現するベクターを作製した。これら 2 者と vesicular stomatitis virus のエンベロープタンパク質（VSV-G）を発現する発現プラスミドの計 3 者をヒト培養細胞（HEK293 株）に共トランスフェクションして pseudotype 型ベクターを得た。HeLa 細胞を指示細胞（標的細胞）として力価を測定したところ安定して  $10^3$ /mL オーダーのベクターを得ることができた。

### A. 研究目的

遺伝子治療において治療遺伝子を標的細胞に効率よく導入し安定的に維持させて当該遺伝子を発現させることが必要である。この目的に近年ヒト免疫不全ウイルス（HIV）を基にしたベクターが用いられてくるようになった。しかし安全性に懸念があって実用化されていない。しかし、HIV のレンチウイルスとしての特徴である非増殖細胞への組込型遺伝子導入方法はおおいに望まれている。そこで効率の良い安全なレンチウイルスベクターを開発するためにヒトへの病原性が低いレンチウイルスを利用することが考えられる。そこで我々はネコ免疫不全ウイルス（FIV）に着目した。FIV は(+) 鎖 RNA をゲノムとして有するレンチウイルスであり、ネコに免疫不全を起こす。Primary receptor はネコ CD134 で Co-receptor はネコ CXCR4 である。ネコ以外の哺乳動物には感染性が無く病原性も低いか無い。本研究では、FIV をベースにしたベクターを作製しその有効性と安全性を調べる事を目的とする。

### B. 研究方法と結果

まず FIV をベースにしたベクターを作製するために、FIV のプロウイルス DNA から始め以下の手順でベクターDNA を作製した。最初に FIV の構造タンパク質をコードする gag, pol, env 遺伝子とアクセサリー遺伝子を含めてほとんどすべてを除きかわりにプラストサイジン耐性遺伝子カセットを挿入した。さらに、3'側 LTR のプロモーター活性を担う U3 領域を大きく除いた。次に FIV の gag と pol 遺伝子を発現するプラスミドベクターを作製した。これら 2 者と vesicular stomatitis virus のエンベロープタンパク質（VSV-G）を発現する発現プラスミドの計 3 者を定法に従ってヒト培養細胞（HEK293 株）に共トランスフェクションして pseudotype 型ベクターを得た。HeLa 細胞を指示細胞（標的細胞）としてプラスト才人耐性コロニー数を指標として力価を測定したところ安定して  $10^3$ /mL オーダーのベクターを得ることができた。

(倫理面への配慮)  
株化培養細胞のみを用い、動物・人体由来サンプルを使用しないので該当しない。

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

#### C. 考察

実用化には力価をもっと上げる必要がある。

#### E. 結論

HIV ベクターと同等に FIV ベクターを作製できた。

#### F. 健康危険情報

該当なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Yan H, Chiba-Mizutani T, Nomura N, Takakura T, Kitamura Y, Miura H, Nishizawa M, Tatsumi M, Yamamoto N, Sugiura W: A novel small molecular weight compound with a carbazole structure that demonstrates potent human immunodeficiency virus type-1 integrase inhibitory activity. *Antiviral Chemistry & Chemotherapy* 16:363-373, 2005.
2. Shiomi K, Matsui R, Isozaki M, Chiba H, Sugai T, Yamaguchi Y, Masuma R, Tomoda H, Chiba T, Yan H, Kitamura Y, Sugiura W, Omura S, Tanaka H. Fungal phenalenones inhibit HIV-1 integrase. *J Antibiot.* 58:65-68, 2005.

##### 2. 学会発表

1. Nuanjun Wichukchinda, Archawin Rojanawiwat, Kitamura Y, Nakayama EE, Panita Pathipvanich, Wattana Auwanit, Pathom Sawanpanyalert, Iwamoto A, Shioda T, Ariyoshi K: Association of DC-SIGNR Polymorphisms With HIV Seronegative Wives of HIV-Seropositive Husbands in Northern Thailand. The 6th Annual Symposium on Antiviral Drug Resistance: Targets and Mechanisms. November 13-16, 2005, Chantilly, Virginia, USA.

## 6. 遺伝子治療用ベクターの安全性評価に関する研究

分担研究者 佐多 徹太郎 (国立感染症研究所感染病理部長)

研究協力者 岩田 奈織子、佐藤 由子、樋口 好美(国立感染症研究所感染病理部)

**研究要旨** 遺伝子ベクター投与後、搭載遺伝子が生体内のどの組織のどの細胞に発現されるのかを解析するためには、その遺伝子産物および細胞マーカー蛋白を in situ で検出することが必要である。現行の免疫組織化学 (LSAB 法、Envision 法など) よりも感度が高い検出法を開発するために高感度 in situ 核酸検出法である in situ hybridization AT tailing 法を蛋白検出に応用し、高感度で特異性に優れた免疫染色法 (Immuno-AT 法) の開発を試みた。細胞標本では、Immuno-AT 法 (間接法) により感度が現行法の 16 倍上昇した。

### A. 研究目的

遺伝子治療に用いるベクターの安全性および有効性を病理学的に評価するシステムを確立することが目的である。病理学的手法として、1) 顕微鏡下での病理学的所見。2) 免疫組織化学によるベクター抗原の検索ならびに発現細胞の同定。3) in situ hybridization 法を用いたベクター核酸の検索ならびに発現細胞の同定。4) microdissection-PCR 法によるベクター核酸の発現量の分布。などがある。今年度は高感度の抗原検出法 (免疫組織化学) の開発を試みた。

### B. 研究方法

高感度 in situ 核酸検出法である in situ hybridization AT tailing (ISH-AT) 法の原理を抗原検出法に適用することを試みた。

#### 1) 二次抗体の AT 修飾

抗マウス IgG ウサギ抗体 F(ab')<sub>2</sub> fragment MW=92000 の H 鎖間の S-S 結合を 2-mercaptoethylamine (2MEA) により特異的に還元し、フリーの SH 基にする。ゲル濾過精製後、合成オリゴ(AT)15 をマレイミド化したものと 4℃で一晩反応後、マウス IgG 固相化アフィニティカラムを通して精製する (図 1)。

#### 2) AT 伸長法

一次抗体の反応後、二次抗体としてオリゴ (AT)15 標識マウス IgG 抗体と 37℃、1 時間反応させる。洗浄後、Klenow fragment (KF) buffer で平衡化した後、AT 伸長反応液 (Klenow fragment, dATP, dTTP, Dig-16-dUTP, KF buffer) を添加する。37℃、2 時間反応させ、二次抗体に結合している AT 部分を伸長させた。伸長部分には DIG 標識 dUTP がとりこまれていくので、抗原部分に DIG が集積することになる (図 2)。また Dig-dUTP のかわりに Alexa488-dUTP を使用してシグナルを蛍光顕微鏡下で直接検出することも試みた。

#### 3) シグナル検出法

AT 伸長反応後、洗浄し、POD 標識抗 DIG 抗体を添加し、シグナルを DAB で染色した。

#### 4) 条件検討

以下の条件を検討した。

i) AT 反応温度: 42℃、37℃

ii) AT 反応時間: 10~60 分

iii) 酵素の種類

#### 5) Vero 細胞ゴルジ体の染色

Vero 細胞を 5%FCS 添加 DMEM/F-12 中、ガラスボトムの培養プレートで培養し、4%PFA で固定したものを実験材料とした。

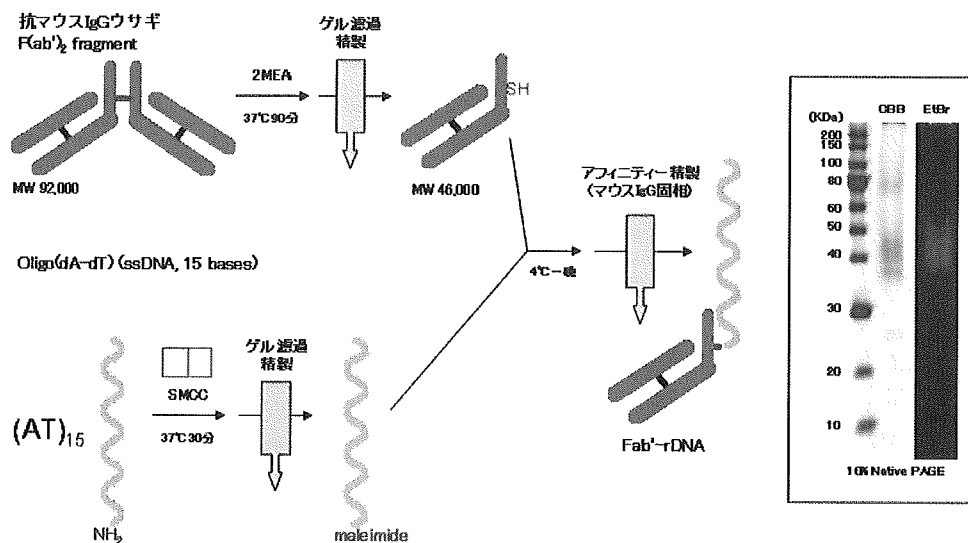
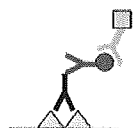


図1 オリゴ(AT)15 標識マウス IgG 抗体

現行法

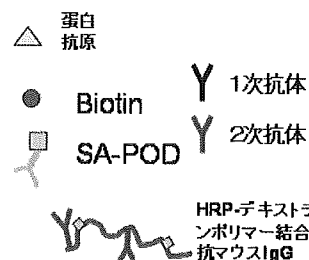
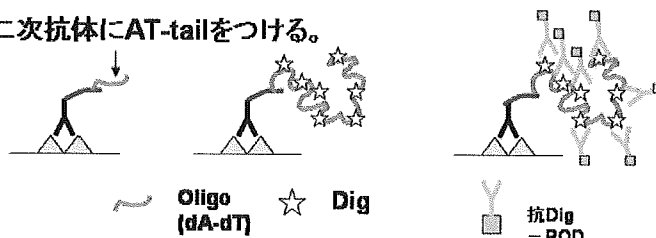
LSAB法



Envision法



Immuno-AT法 二次抗体にAT-tailをつける。  
(間接法)



	一次抗体	二次抗体	標識検出
(1) Envision	マウスmAb	HRP-デキストランポリマー結合抗マウスIgG	HRP
(2) Immuno-AT (間接法)	マウスmAb	Oligo(dA-dT)標識抗マウスIgG	Dig 抗dig-POD

図2 Immuno-AT 法(間接法)

## C. 研究結果

### 1) オリゴ(AT)15 標識マウス IgG 抗体の調整

調整したオリゴ(AT)15 標識マウス IgG 抗体を 10%PAGE し、クマシー染色すると図 1 に示したように 45 kD あたりと 90kD あたりにバンドが見えた。90 kD のバンドは再重合してしまったものであると考えられた。エチジウムブロマイドで核酸(AT 部分)を染色すると 45 kD で優位に修飾されていることが確認できた。

### 2) Immuno-AT 法

Immuno-AT 法(間接法)により vero 細胞のゴルジ体を検出した。

#### a) AT 伸長反応温度

AT 伸長反応温度を 37°C と 42°C で行い、現行法の Envision 法と比較した。一次抗体の希釈率を 25,000 倍から 400,000 倍まで振って検出限界希釈倍率の逆数を相対的な検出感度として比較した。図 3 に示すように 42°C の方が 37°C よりも高感度であった。またこのときの感度は現行法の 16 倍であった。

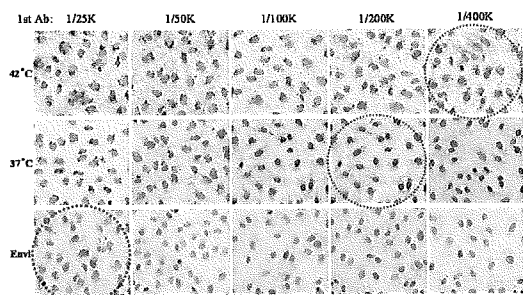


図3 酵素反応温度と検出感度  
Vero 細胞のゴルジ体染色

#### b) AT 伸長反応時間

AT 伸長反応時間を 10, 20, 30, 40, 50, 60 分で行い、検出感度を比較した。図 4 に示すように反応時間が長いほど検出感度も上昇した。

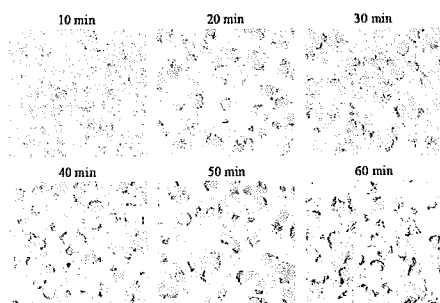


図4 酵素反応時間と検出感度  
Vero 細胞のゴルジ体染色

### c) 酵素の種類

Klenow fragment(exo-), Bst polymerase, Terminator polymerase, Phi29 polymerase, Vent(exo-) polymerase, KOD polymerase, T7 polymerase(exo-), ΔTth polymerase, Pyrobest polymerase の 9 種類の酵素を用いた場合を比較検討した。40,000 倍希釈した抗ゴルジ抗体を 1 時間、400 倍希釈した AT 標識二次抗体を 30 分反応させ、酵素反応は 37°C と 65°C 各 30 分で検討した。37°C では Klenow fragment(exo-)のみで抗原検出した。Klenow fragment(exo-)は 65°C でより高感度であった。抗原が熱で変性することを考えて 37°C で良好だった Klenow fragment(exo-)が immuno-AT 法では適当であると考えられた。

## D. 考察

ベクターや導入遺伝子産物が生体内でどのような蛋白(抗原)を発現しているかを病理学的に検索するためには、あらゆる条件の標本に適用できる高感度な抗原検出法の開発が必要である。今回、オリゴ(AT)15 標識した抗体を用いた Immuno-AT(間接法)、を用いて Vero 細胞ゴルジ体を検出した結果、現行法と比較して 16 倍の検出感度が得られた。さらに高感度にするためには、以下の試みが必要である。AT 修飾効率の改良、AT 修飾した抗体の精製法の改良、酵素および反応温度の再検討、CSA 法などシグナル増幅法の併用、Immuno-AT(直接法)、Immuno-(AT)2 他、3 次抗体-AT の使用などの試みである。実際にはホルマリン固定パラフィン包埋組織切片における検出で検討改良していく予定である。

## E. 結論

Immuno-AT 法を用いて、遺伝子ベクター投与後の生体内での遺伝子発現等をより詳細に解析できることが期待される。

## F. 健康危険情報

特になし

## G. 研究発表

該当なし

## H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

## 7. サルをモデルとするウイルスベクターの安全性・有効性評価に関する研究

分担研究者 寺尾 恵治 (国立感染症研究所筑波医学実験用霊長類センター長)

研究協力者 明里 宏文、飯島 沙幸、李 永仲

(国立感染症研究所筑波医学実験用霊長類センター)

石井 孝司、吉崎 佐矢香、鈴木 哲朗、宮村 達男

(国立感染症研究所ウイルス2部)

**研究要旨** 本研究ではC型肝炎ウイルスの予防・治療ワクチンとして弱毒ワクチニアウイルス DIs 株をウイルスベクターとしたリコンビナントワクチンを構築し、これを動物レベルにおいて有効性及び安全性の評価を行うことを目的とする。今年度は、上記ウイルスベクターによる HCV-DIs ワクチンおよび有効性評価用ワクチンとしてのサル類C型肝炎様ウイルスである GBVB-DIs ワクチンの開発を行い、動物レベルにおける免疫誘導能を評価した。その結果、マウスにおいて顕著な液性および細胞性免疫の誘導が確認された。今後これらを用いて、霊長類における安全性および有効性の評価を行う予定である。

### A. 研究目的

C型肝炎ウイルス(HCV)は慢性肝炎、肝硬変、肝細胞癌の主要な原因ウイルスである。現在のHCV感染者は我が国に約200万人、世界中には1.7億人(HIV感染者の4倍)にのぼり、毎年3万人もの国民がHCV感染に起因する肝細胞癌で死亡している。現在最善の治療法であるPEG-IFN/リバビリン併用療法の有効率は50%程度でありHCV感染者の半数はなお肝臓癌発症のリスクを避けられない現状を鑑み、C型肝炎の治療法開発およびワクチン・創薬研究は厚生行政上急務である。この問題を克服するべく、本研究ではHCVの感染・発症予防ワクチンとして弱毒ワクチニアウイルス DIs 株をウイルスベクターとしたリコンビナントワクチンを構築し、これを動物レベルにおいて有効性及び安全性の評価を行うことを目的とする。昨年度においては、まず評価システムの構築を目指し、C型肝炎のサロゲート病態動物モデルの開発を試みた。その結果、HCVに最も近縁なサル肝炎ウイルスであるGBV-Bを新世界ザ

ルの一種であるタマリンに感染することにより、ウイルス増殖に伴う急性C型肝炎様症状を発症させることに成功した。

そこで今年度は、上記ウイルスベクターによるHCV-DIs ワクチンおよび有効性評価用ワクチンとしてのGBVB-DIs ワクチンの開発を行うとともに、動物レベルにおける免疫誘導能を評価した。

### B. 研究方法

ワクチニアウイルスのプロモーターmH5の下流にHCVおよびGBV-B遺伝子の一部が挿入されたトランスファーベクターを作成し、homologous recombinationの手法を用いてDIsに導入した。

得られた組換えDIsについて、HCVおよびGBV-B蛋白の発現の確認を行った。また、これらの組換えDIsをマウスに接種し液性及び細胞性免疫応答について評価した。液性免疫は組換えバキュロウイルスを用いて発現させた

HCV 蛋白を抗原として ELISA 法により、細胞性免疫は、ウイルスが発現する HCV の蛋白に対応する overlapping peptides を用いてマウス脾臓細胞を刺激し、ELISPOT assay による IFN-g 分泌細胞数の測定及び MTT assay による細胞増殖能を測定した。

(倫理面への配慮)

なおすべての動物実験は、倫理面を含めて国立感染症研究所および医薬基盤研究所の動物実験委員会にて審査・承認を得て実施した。

### C. 研究結果

DIs 株に HCV もしくは GBV-B の core-E1-E2 領域、NS3 領域、NS5A 領域及び全長に相当する遺伝子領域を組み込んだ組換え DIIs を作成し、それぞれの組換え DIIs を哺乳類細胞に感染させると目的蛋白が発現されることを確認した。core-E1-E2 領域を発現する組換え DIIs をマウスに接種した場合、core、E2 いずれの蛋白に対する抗体も検出され、NS3、NS5A を発現するウイルスでもそれぞれに対する抗体が検出されたことから、組換え DIIs の投与により目的の組換え蛋白に対する液性免疫を誘導できることが確認された。また、いずれの組換え DIIs を接種した場合も、ELISPOT assay 及び MTT assay により目的蛋白に対する細胞性免疫が誘導されることを確認することができた。

### D. 考察

DIs 株に HCV もしくは GBV-B の core-E1-E2 領域、NS3 領域、NS5A 領域及び全長に相当する遺伝子領域を組み込んだ組換え DIIs を作成し、それぞれの組換え DIIs を哺乳類細胞に感染させると目的蛋白が発現されることを確認した。core-E1-E2 領域を発現する組換え DIIs をマウスに接種した場合、core、E2 いずれの蛋白に対する抗体も検出され、NS3、NS5A を発現するウイルスでもそれぞれに対する抗体が検出されたことから、組換え DIIs の投与により目的の組換え蛋白に対する液性免疫を誘導できることが確認された。また、いずれの組換え DIIs を接種した場合も、ELISPOT assay 及び MTT assay により目的蛋白に対する細胞性免疫が誘導されることを確認することができた。

### E. 結論

本研究ではウイルスベクターによる HCV ワクチン等の安全性・有効性を評価することを目的として、C 型肝炎のサロゲート病態動物モデルの開発を試みた。その結果、HCV に最も近縁なサル肝炎ウイルスである GBV-B を新世界ザルの一種であるタマリンに感染することにより、急性 C 型肝炎様症状を発症させることに成功した。霊長類を用いた本モデルはウイルスベクターの安全性・有効性評価に有用であると考えられた。

### F. 健康危険情報

特になし

### G. 研究発表

#### 1. 発表論文

1. Ageyama N, Hanazono Y, Shibata H, Ono F, Ogawa H, Nagashima T, Ueda Y, Yoshikawa Y, Hasegawa M, Ozawa K and Terao K. Safe and efficient collection of cytokine-mobilized peripheral blood cells from cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*) with human newborn-equivalent body weights. *Exp Anim.*, 2005, 54: 421-428.
2. Uda A, Tanabayashi K, Fujita O, Hotta A, Terao K, Yamada A. Identification of the MHC class I B locus in cynomolgus monkeys. *Immunogenetics.* 2005, 57:189-197.
3. Uda A, Tanabayashi K, Mukai R, Terao K, Yamada A. Detection of CD3epsilon polymorphism in cynomolgus monkeys by a method based on RFLP. *J Med Primatol.* 2004, 33:34-37.
4. Nagashima T, Ueda Y, Hanazono Y, Kume A, Shibata H, Ageyama N, Terao K, Ozawa K, Hasegawa M. In vivo expansion of gene-modified hematopoietic cells by a novel selective amplifier gene utilizing the erythropoietin receptor as a molecular switch. *J Gene Med.* 2004, 6:22-31.
5. Shibata H, Hanazono Y, Ageyama N, Nagashima T, Ueda Y, Hasegawa M, Ozawa K, Yoshikawa Y, Terao K. Collection and analysis of hematopoietic progenitor cells from cynomolgus macaques (*Macaca fascicularis*): Assessment of cross-reacting monoclonal antibodies. *Am J Primatol.* 2003,

61:3-12.

6. Uda A, Tanabayashi K, Mukai R, Terao K, Yamada A. Identification of an amino acid responsible for the CD3 polymorphism in cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*). *J Med Primatol.* 2003, 32:105-110.
7. Ageyama N, Kimikawa M, Eguchi K, Ono F, Shibata H, Yoshikawa Y, Terao K. Modification of the leukapheresis procedure for use in rhesus monkeys (*Macaca mulata*). *J Clin Apheresis.* 2003, 18:26-31.
8. Nagashima T, Ueda Y, Hanazono Y, Kume A, Shibata H, Ageyama N, Terao K, Ozawa K, Hasegawa M. New selective amplifier genes containing c-Mpl for hematopoietic cell expansion. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003, 303:170-176.

## 2. 学会発表

1. 飯島沙幸、石井孝司、李永仲、八木慎太郎、山口健次郎、榎 昇、吉崎佐矢香、町田早苗、木村展之、揚山直英、寺尾恵治、鈴木哲朗、宮村達男、明里宏文：サル類を用いたC型肝炎の新規感染病態モデルの樹立。第140回日本獣医学会学術集会、平成17年9月

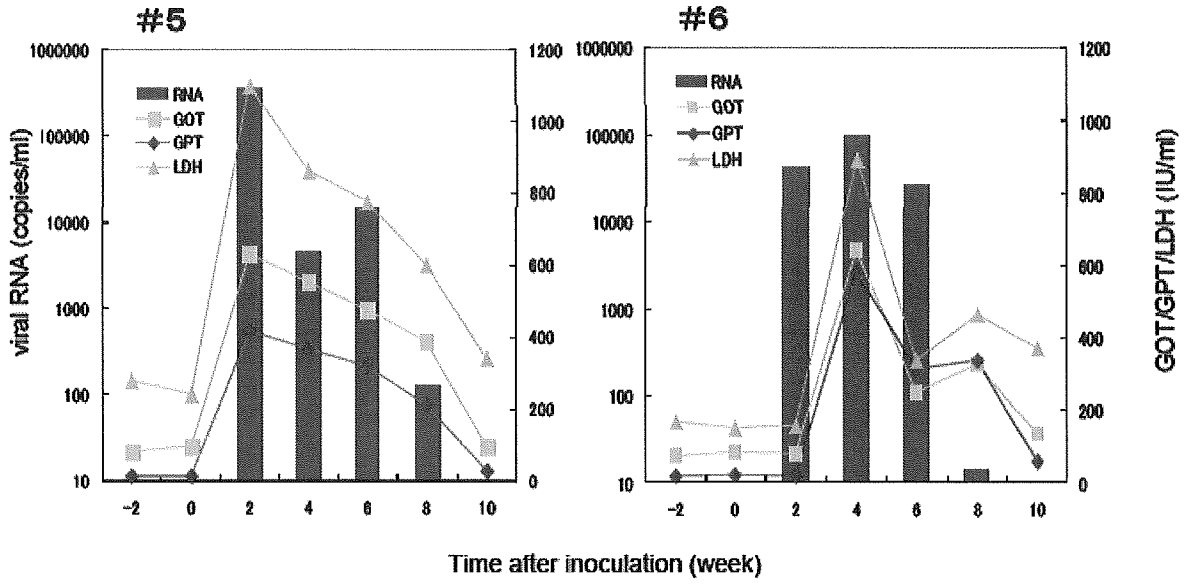
## H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし



# GBV-B / Tamarin感染実験1:結果

## viral RNA量と血清生化学値



## viral RNA量と抗体価

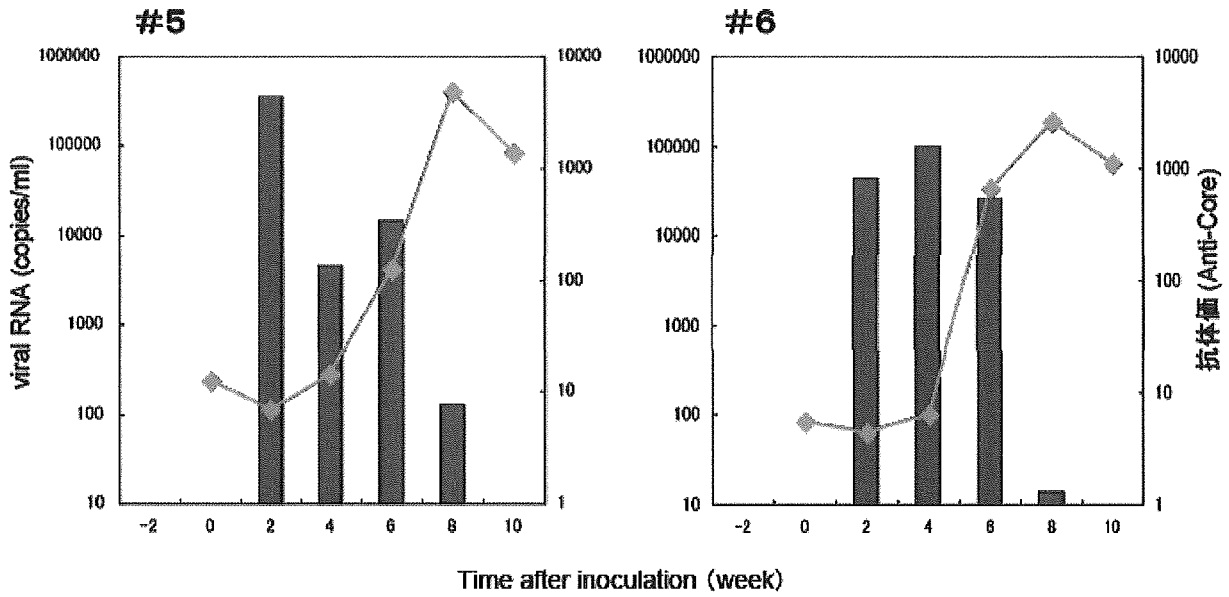


図1. GBV-B/タマリン感染実験(1)結果

## GBV-B /Tamarin感染実験(2)

### Viral RNA量と血清生化学値

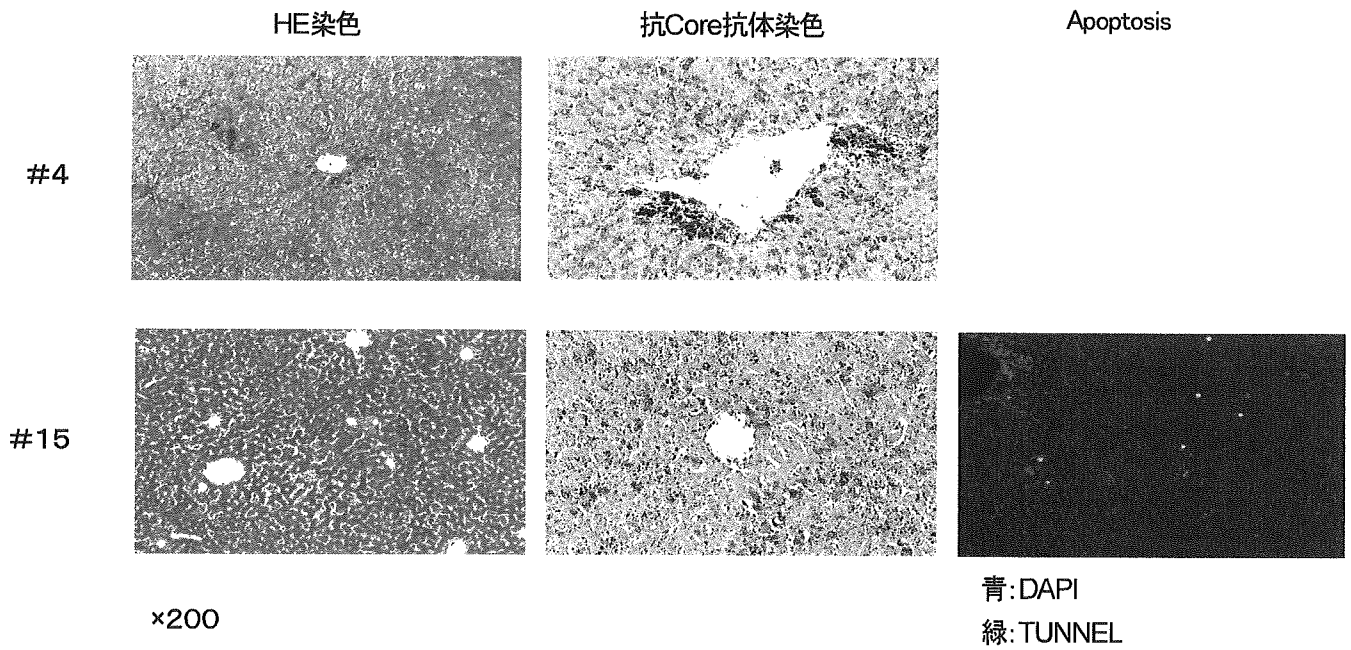
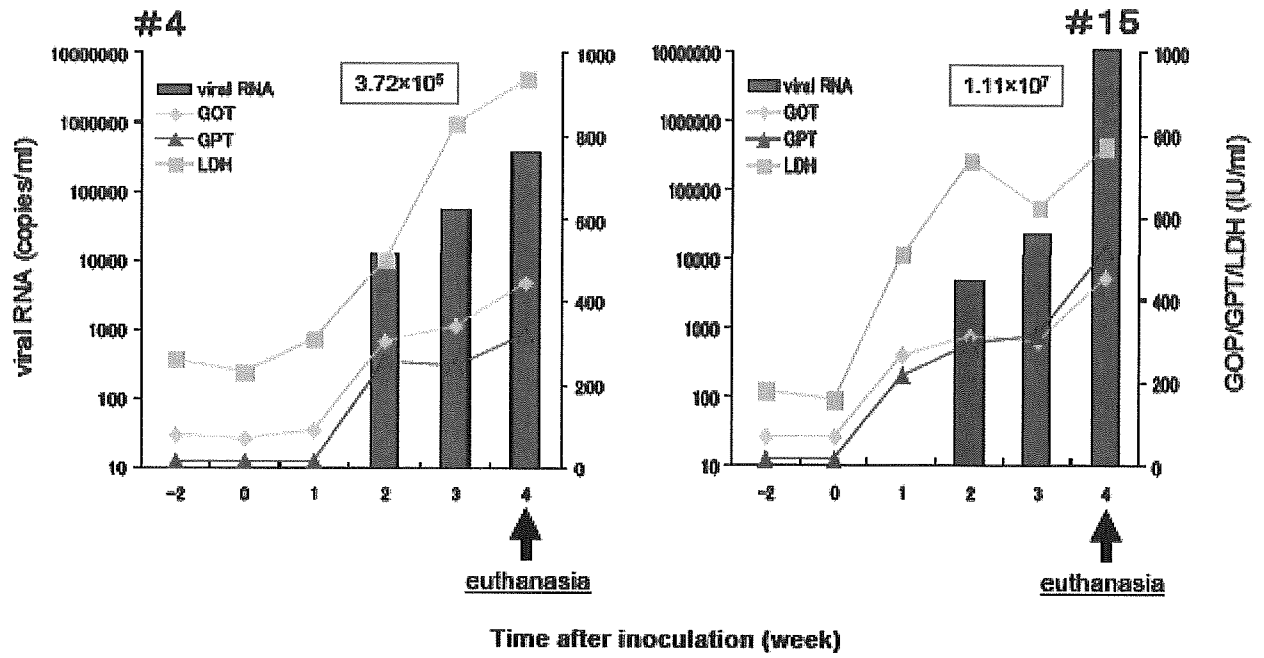


図2. GBV-B/タマリン感染実験(2)結果

### III. 研究成果の刊行に関する一覧表

## 研究成果の刊行に関する一覧表

著者氏名	論文タイトル名	発表誌名	刊名	ページ	出版年
Koshizuka T, Kawaguchi Y, Goshima F, Mori I, Nishiyama Y	Association of two membrane proteins encoded by herpes simplex virus type2, UL11 and UL56.	Virus Genes	in press		
Kawada M, Igarashi H, Takeda A, Tsukamoto T, Yamamoto H, Dohki S, Takiguchi M, Matano T	Involvement of multiple epitope-specific cytotoxic T-lymphocyte responses in vaccine-based control of simian immunodeficiency virus replication in rhesus macaques.	J Virol	80	1949-1958	2006
Kato A, Yamamoto M, Ohno T, Tanaka M, Sata T, Nishiyama Y, Kawaguchi Y	Herpes simplex virus 1-encoded protein kinase UL13 phosphorylates the viral US3 protein kinase and regulates nuclear localization of viral envelopment factors UL34 and UL31.	J Virol	80	1476-1486	2006
Yan H, Chiba-Mizutani T, Nomura N, Takakura T, Kitamura Y, Miura H, Nishizawa M, Tatsumi M, Yamamoto N, Sugiura W	A novel small molecular weight compound with a carbazole structure that demonstrates potent human immunodeficiency virus type-1 integrase inhibitory activity.	Antiviral Chem Chemo	16	363-373	2005
Mori I, Goshima F, Mizuno T, Imai Y, Kohsaka S, Ito H, Koide N, Yoshida T, Kimura Y, Yokochi T, Nishiyama Y	Axonal injury in experimental herpes simplex encephalitis.	Brain Res	1057	186-190	2005
Ageyama N, Hanazono Y, Shibata H, Ono F, Ogawa H, Nagashima T, Ueda Y, Yoshikawa Y, Hasegawa M, Ozawa K, Terao K	Safe and efficient collection of cytokine-mobilized peripheral blood cells from cynomolgus monkeys ( <i>Macaca fascicularis</i> ) with human newborn-equivalent body weights.	Exp Anim	54	421-428	2005
Uda A, Tanabayashi K, Fujita O, Hotta A, Terao K, Yamada A	Identification of the MHC class I B locus in cynomolgus monkeys.	Immuno-genet	57	189-197	2005
Shiomi K, Matsui R, Isozaki M, Chiba H, Sugai T, Yamaguchi Y, Masuma R, Tomoda H, Chiba T, Yan H, Kitamura Y, Sugiura W, Omura S, Tanaka H	Fungal phenalenones inhibit HIV-1 integrase.	J Antibiot	58	65-68	2005
Kudoh A, Fujita M, Zhan L, Shirata N, Daikoku T, Sugaya Y, Isomura H, Nishiyama Y, Turumi T	Epstein-Barr virus lytic replication elicits ATM checkpoint signal transduction while providing an S-phase-like cellular environment.	J Biol Chem	280	8156-8163	2005