

200500902 A

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

エイズ医薬品候補物質のスクリーニングを基盤とした、  
抗エイズ新薬開発に関する研究

平成17年度 総括・分担研究報告書

主任研究者

棚元 憲一

平成18(2006)年 4月

エイズ医薬品候補物質のスクリーニングを基盤とした、

抗エイズ新薬開発に関する研究

平成17年度 研究組織

主任研究者

棚元 憲一 国立医薬品食品衛生研究所 食品添加物部 部長

分担研究者

牛島 廣治	東京大学大学院	医学系研究科	教授
小河 正雄	大分県衛生環境研究センター	微生物部	主幹研究員
千々和勝己	福岡県保健環境研究所	保健科学部	課長
秋吉 京子	神戸市環境保健研究所	微生物部	研究員
石崎 徹	京都府保健環境研究所	細菌・ウイルス課	主任研究員
貞升 健志	東京都健康安全研究センター		主任研究員
齋藤 隆行	神奈川県衛生研究所	微生物部	専門研究員
本間 寛	北海道立衛生研究所	微生物部ウイルス科	所長
野口 有三	横浜市衛生研究所	検査研究課	課長補佐
大竹 徹	大阪府立公衆衛生研究所	感染症部ウイルス課	課長
山本 直彦	名古屋大学大学院	医学系研究科	助教授
星野 洪郎	群馬大学大学院	医学系研究科	教授

協力研究者

須賀 知子	神戸市環境保健研究所
山田 明	滋賀県立大学
新開 敬行	東京都健康安全研究センター
長島 真美	東京都健康安全研究センター
甲斐 明美	東京都健康安全研究センター
諸角 聖	東京都健康安全研究センター
伊木 繁雄	北海道立衛生研究所
森 治代	大阪府立公衆衛生研究所
川畑 拓也	大阪府立公衆衛生研究所
森下 高行	愛知県食品衛生検査所
沖津 祥子	東京大学大学院医学系研究科
柳生 文宏	東京大学大学院医学系研究科

# 目 次

## I 総括研究報告

- エイズ医薬品候補物質のスクリーニングを基盤とした、  
抗エイズ新薬開発に関する研究・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・1  
棚元 憲一

## II 分担研究報告

1. エイズおよび関連する新興・再興ウイルス感染症の医薬品候補物質の  
スクリーニングと新薬開発に向けた研究・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・14  
牛島 廣治
2. エイズ医薬品候補物質のスクリーニングを基盤とした、抗エイズ新薬開発に関する研究・・・・・・・・19  
小河 正雄
3. エイズ医薬品候補物質のスクリーニングを基盤とした、抗エイズ新薬開発に関する研究・・・・・・・・22  
千々和勝己
4. エイズ医薬品候補物質のスクリーニングを基盤とした、抗エイズ新薬開発に関する研究・・・・・・・・26  
秋吉 京子
5. エイズ医薬品候補物質のスクリーニングを基盤とした、抗エイズ新薬開発に関する研究・・・・・・・・28  
抗 HIV 候補薬のリアルタイム PCR 法を応用した薬剤のスクリーニング II・・・・・・・・・・・・30  
石崎 徹
6. エイズ医薬品候補物質のスクリーニング研究・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・36  
貞升 健志
7. エイズ医薬品候補物質のスクリーニング研究・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・40  
齋藤 隆行
8. エイズ医薬品候補物質のスクリーニングを基盤とした、抗エイズ新薬開発に関する研究・・・・・・・・41  
本間 寛
9. エイズ医薬品候補物質のスクリーニング研究・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・45  
野口 有三
10. MAGIC-5A 細胞を用いた抗 HIV 活性スクリーニング試験および抗 HIV 作用メカニズムの検討・・・・47  
大竹 徹
11. MAGIC 5 A 細胞を用いたスクリーニング試験と陽性サンプルの HIV-1 薬剤耐性臨床分離ウイルス  
に対する抑制活性・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・53  
山本 直彦
12. スクリーニング法の開発、作用メカニズムの解明・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・56  
星野 洪郎

## III. 研究成果の刊行に関する一覧表

## IV. 研究成果の刊行物

## 厚生科学研究費補助金（創薬等ヒューマンサイエンス総合研究事業）

### 総括研究報告書

エイズ医薬品候補物質のスクリーニングを基盤とした、抗エイズ新薬開発に関する研究

主任研究者 棚元憲一 国立医薬品食品衛生研究所食品添加物部部长

**研究要旨：**1 企業、7 大学及び 1 国公立研究所から寄せられた合計 505 サンプルについて抗 HIV 活性スクリーニングを行った結果、マイクロプレート法では 5 サンプルに、またマクロファージ好性ウイルスの増殖抑制においても 27 サンプルと、延べ 32 の物質に活性が認められた。また昨年度の陽性サンプルにつき作用機作の検討を行った。新規スクリーニング法として開発した GFP 発現を指標とする方法、及びリアルタイム PCR 法を応用した方法の検証を行い、抗 HIV 剤スクリーニングへの応用が可能であること、さらに、後者は新たな作用領域の推定にも応用できることがわかった。

#### 分担研究者

本間 寛	北海道立衛生研究所
石崎 徹	京都府保健環境研究所
貞升 健志	東京都健康安全研究センター
齋藤 隆行	神奈川県衛生研究所
大竹 徹	大阪府立公衆衛生研究所
秋吉 京子	神戸市環境保健研究所
小河 正雄	大分県衛生環境研究センター
野口 有三	横浜市衛生研究所
千々和勝巳	福岡県保健環境研究所
牛島 廣治	東京大学医学系研究科
星野 洪郎	群馬大学医学系研究科
山本 直彦	名古屋大学医学系研究科

#### A. 研究目的

現在までに幾つかのエイズウイルスに対する医薬品が開発されてきた中で、多剤併用療法が延命効果を示し、死亡率の低下が報告されている。しかし、その効果発現には薬の継続投与が必要であり、それによる副作用、さらには耐性ウイルスの出現等の

問題が起こってきている。一方、米国やアフリカ等に比べ日本のエイズ患者は少ないものの、血液製剤の投与による感染や、近年では性交渉による感染の増加傾向も窺え、特に若年層における感染増加が深刻な社会問題となっている。以上のように決定的な薬剤がない現在、耐性ウイルスにも効果を示す、新しいメカニズムを有する新薬が切望されている。一方、新薬候補物質の探索のためのスクリーニングを行うには、それなりの施設、背景、合目的性が必要であることから、大企業はともかく、候補物質を多く持っている企業、大学は容易にシステムを持っていないのが現状であり、その意味で日本国内を見た場合、必ずしもエイズ医薬品候補物質探索が有効に機能しているとは思えない。このような背景を受けて本研究では、以下の 3 本柱を掲げてエイズ医薬品の探索、さらには創薬への発展を目指す。一つ目は、この研究班の基盤である、従来より行ってきた新薬候補物質探索のためのスクリーニング研究を、より拡張した形で継承することである。戦略として、従来は

H S財団経由のみで、極めて短期間のサンプル収集であったところを、より幅広いルート開発と、期間を限定せず通年でのサンプル収集およびスクリーニングの実施を行う。また、スクリーニング法も従来の MT-4 細胞に対する細胞傷害性抑制試験および Molt 4 細胞を用いた巨細胞形成抑制試験に加え、マクロファージ好性 Magic 5 細胞アッセイも加えて幅広いスクリーニングを行っている。さらに遺伝子工学的技術を用いて、迅速かつ高精度で、新たな作用点を有する薬剤発見にもつながるスクリーニング法の開発を行う。2つ目は、当研究班で見いだした有力な活性物質群、さらには今後補足される医薬品候補物質の創薬に向けての基礎的な研究である。系統的な作用点の解析による作用機構の解明、in vivo 実験、さらには物質の化学修飾・部分合成等により、創薬への開発研究に繋げようと言うものである。さらに3つ目は耐性ウイルス対策として、薬剤耐性株のライブラリー、サブタイプ別の株のライブラリーを作製し、2次スクリーニングとして1次スクリーニング陽性の薬剤に対して変異株に対する有効性を確認する。以上のように、本研究は広範な未知物質の探索を行い、さらに薬剤の開発に向けた作用メカニズムや生理作用についても詳しい解析を行うことによって、総合的な新規エイズ医薬品の開発へと系統的に発展させるものである。

## B. 研究方法

### エイズ医薬品候補物質スクリーニング

本研究班では、以下の研究方法によりエイズ医薬品候補物質のスクリーニング研究を行った。

(1) ヒューマンサイエンス財団を通して企業、大学研究所に対し、エイズ医薬品候補物質のスクリーニング研究への募集を募る。加えて、研究班独自に開発したルートにより幅広い募集を行った。スクリーニング応募者には、応募サンプルを医薬品の特性、希望活性測定条件等を記して、原則として1件につき2サンプル国立医薬品食品衛生研究所に送付してもらう。

(2) 国立医薬品食品衛生研究所に送付された化学物質等は通し番号をうち、製品名は伏せたまま各分担研究者に送付する。

(3) まず MT-4 細胞の HIV 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により、エイズ医薬品候補物質の抗 HIV 活性のスクリーニング研究を行う。陽性対照としては AZT(3'-azido-3'-deoxythymidine)やデキストラン硫酸を使用する。マイクロプレート法を終えたサンプルはさらに、愛知衛研及び大阪府公衆衛研において MAGIC-5 細胞を用いたスクリーニングを行う。ウイルス取り扱い法とスクリーニングに関する技術的な問題は班会議において検討し、技術と実験方法の統一を計っている。

以下にマイクロプレート法及び MAGIC-5 アッセイ法を記す。

a) マイクロプレート法：抗 HIV 物質の細胞毒性と抗 HIV 活性を測定するプレートを用意する。両プレートとも 96 穴平底培養プレートを使用し、左端 8 穴に 10%FCS 加 RPMI1640 培地で所定の濃度に希釈した試料溶液を加える。残りの穴には培地を 100  $\mu$ l ずつ入れ、左端の穴から 8 連ピペットで 2 倍あるいは 5 倍段階希釈を 11 穴 (5 倍希釈については 8 穴) まで行い、12 穴目は薬剤

濃度を 0 として細胞増殖及び HIV 感染のコントロールとする。被検薬剤 1 種類につき細胞毒性と抗 HIV 活性測定プレートのそれぞれ 2 列を使用する。細胞毒性測定用には、対数増殖期にある MT-4 細胞を集め、その  $2 \times 10^6$  個を 10 ml の培地に再浮遊し、被検薬剤をすでに加えたプレートのすべての穴に 100  $\mu$ l ずつ加えた。一方、抗 HIV 測定用のプレートには遠心分離により集めた  $2 \times 10^6$  の MT-4 細胞に 100TCID<sub>50</sub> となるように HIV (HTLV-B) のストック溶液を加え、37°C、1 時間感染させた後、培地 10 ml で再浮遊し抗 HIV 活性測定プレートのすべての穴に 100  $\mu$ l 加える。培養 5 日目に顕微鏡により HIV による細胞変性効果 (CPE) と細胞毒性を観察する。

b) MAGIC-5 アッセイ法：ウエルあたり 10,000 個の MAGIC 5A 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する。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) した薬剤液を加える。その後 HIV-1 Ba-L 株を 100~200BFU/50  $\mu$ l になるように DEAE-dextran 添加培養液で調整し加える。37°C の CO<sub>2</sub> インキュベーターで 48 時間培養する。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 MgCl<sub>2</sub> and 400  $\mu$ g/ml X-gal.) を加えて、37°C で 1 時間インキュベートする。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する。抗 HIV 活性陽性検体として TAK-779 および AZT を用いる。

(4) これらのスクリーニングで活性が認められたサンプルに関しては、生細胞数測定法や巨細胞形成抑制法により、抗 HIV 活性の確認を行う。また被検物質によっては、逆転写酵素活性阻害等も試験する。

以下に巨細胞形成抑制法を示す。

c) 巨細胞形成抑制法：平底 24 well plate に所定の濃度に希釈した試料溶液 500  $\mu$ l を加える。培地に懸濁した持続感染 Molt-4/HIV 細胞浮遊液  $1 \times 10^6$  個/ml を 250  $\mu$ l/well 加え、さらに非感染 Molt-4 細胞浮遊液  $1 \times 10^6$  個/ml を 250  $\mu$ l/well 加え、攪拌し、CO<sub>2</sub> 存在下、37°C で混合培養する。混合培養後数時間で巨細胞形成は認められ、20 時間後には顕著となる。検鏡により試料の巨細胞形成抑制効果を判定する。結果を定量的に求める場合は検鏡後、培養液をよく攪拌した後、少量をサンプリングし、トリパンブルー染色により生細胞数を測定し、Fusion Index (被検生細胞数/対照生細胞数) を算出する。

(5) 地方衛研で得られた実験結果は、国立医薬品食品衛生研究所で集計し、活性物質、判定不能なサンプルを再検討し、班会議において最終判定を行う。試験成績は国立医薬品食品衛生研究所を経て、ヒューマンサイエンス振興財団から提出企業に報告される。

活性物質の作用機作研究：スクリーニングの結果、特に強い活性を示した物質につき、CCR5 および CXCR4 分子への作用をこれらのモノクローナル抗体の結合抑制試験により調べた。抗体としては FITC ラベルした 45531.111、2D7/CCR5、及び 12G5、44716.111 をそれぞれ用いた。2 次抗体として FITC 標識抗マウス IgG2a もしくは IgG2b 抗体を用

い、フローサイトメーターで蛍光強度を測定した。

#### 新規スクリーニング方法の開発

1) GFP 発現を指標とした HIV 感染検出系の開発: R5 あるいは X4 タイプの HIV-1 に非常に感受性の高い NP-2/CD4/CCR5 あるいは NP-2/CD4/CXCR4 細胞に、HIV-1 の promoter の下流に nuclear localization signal を持つ green fluorescent protein (GFP) 遺伝子を持つプラスミドを導入し、HIV-1 の感染を簡単に、かつ迅速に検出でき、また感染経過を経時的に観察できる細胞系を昨年度開発した。数十種類の物質について、NP-2/CD4 細胞系を用い、抗 HIV-1 剤のスクリーニング、及び抗 Tat 剤のスクリーニングが可能かを検討した。

2) リアルタイム PCR 法を応用したスクリーニング法の開発: マイクロプレート法の目視による判定の代わりに、産生された HIV の mRNA の種々の遺伝子 (env, pol, gag 領域) をリアルタイム PCR で増幅し、抗 HIV 活性の状態を、ウイルス形成過程の各ステージで定量的に解析する方法について検討を行う。今年度は設計したプライマー、プローブの有効性についても検討した。

#### 薬剤耐性感染性クローンの作成

HXB2・PRL90M 感染性クローンは pSUM8 plasmid を用いて、protease gene の codon 90 の TTG を ATG に site-directed mutagenesis により作成した。また、HXB2・PRM46I 感染性クローンは、同様に pSUM8 plasmid を用いて、protease gene の codon 46 の ATG を ATA に変換し、作成した。

### **C. 研究結果**

#### エイズ医薬品候補物質スクリーニング

1 企業、7 大学及び 2 国公立研究所から寄せられた合計 505 サンプルについて、マイクロプレート法及びマクロファージ系 MAGIC-5A 細胞を用いた抗 HIV 活性スクリーニングを行った。その結果、マイクロプレート法では表 1 に示すように 5 サンプルにおいて抗 HIV 活性が認められ、27 サンプルが MAGIC-5 アッセイで活性を示した。これらのうちマイクロプレート法及び MAGIC-5A アッセイ両方に活性を示したものはわずか 4 サンプルであり、多くのものは T 細胞好性ウイルス及びマクロファージ好性ウイルスの増殖を選択的に抑制した。活性強度に関してはマイクロプレート法で  $0.8\mu\text{g}/\text{ml}$  でも有効なサンプルが見いだされ、またマクロファージ好性ウイルスの増殖を抑制したサンプルの中には  $\text{IC}_{50}$  が  $0.47\mu\text{g}/\text{mL}$  という強い抗ウイルス効果を示したものがあった。なお、05001-05004 のサンプルは既知のエイズ陽性物質 (5004) 及びその誘導体であり、最も強い活性を示したサンプルが既知物質であるため、その誘導体化による活性上昇は見られないという、ネガティブなデータであった (従ってこれらのサンプルは、スクリーニング結果として陽性物質にはカウントしていない)。

#### 活性物質の作用機作研究

マクロファージ好性 HIV-1 の増殖を抑制した 3 種の薬剤につき MAGIC-5A 細胞を標的にした抗 CCR5 モノクローナル抗体の結合への影響を調べたが抑制効果は見られず、薬剤の作用点を特定することができなかったが、T 細胞好性 HIV-1 の増殖を抑制した 2 種の薬剤は MOLT-4 細胞を標的にした抗 CXCR4 モノクローナル抗体の結合を抑制したことから、CXCR4 分子に何らかの作用を

及して抗ウイルス効果を示したことが示された。

#### 新規スクリーニング方法の開発

1) GFP 発現を指標とした HIV 感染検出系の開発：昨年開発した系を用い、核酸関連化合物 50 種類について、抗 HIV-1 活性を検討したが、有効なものは検出できなかった。タイで飲用されている 4 種類のお茶の粗抽出物には、弱いながら抗 HIV-1 活性が認められた。緑茶由来のカテキン類に抗 HIV-1 作用があることが報告されており、この系の結果でも確認されことになる。

X4 タイプの HIV-1 の Env 及び Tat を発現する HeLa 細胞と N4X4/GFP 細胞を混合培養すると、著明な合胞体が形成され、細胞の核が GFP 陽性となった。この現象は、AMD3100 で強く抑制された。強い抗 HIV-1 作用を持つことが知られている AZT と AMD3100 をこの系で検討し、期待通りの結果が得られたことになる。これによってこの系の信頼性が確認された。

2) リアルタイム PCR 法を応用したスクリーニング法の開発：標準ウイルスの HIV( HTLVIII b 株)において、設計したプライマー、プローブを用いたところ、gag, pol, env 遺伝子の特異的増幅が認められた。また、AZT を作用させた HIV 感染 MT-4 細胞からの mRNA について、gag、env 遺伝子の特異的増幅は認められたが、pol 遺伝子の増幅は認められず、AZT の薬理作用による遺伝子増幅抑制を顕著に捉えることができた。

#### 耐性ウイルスに対する研究

昨年度プロテアーゼ阻害剤耐性臨床分離株で解析された耐性関連変異のデータをもとに、感染性クローンを使用し、L90M お

よび M46I に変異をもつ耐性感染性クローンを作成した。今回作成した感染性クローンはそれぞれ Saquinavir, Indinavir に耐性を示し、さらに野生株と同等の複製能をもち、耐性スクリーニングを行なう上で有用であることが示された。

#### **D. 考察**

サンプル収集に関しては、従来は HS 財団の募集による収集のみであったが、昨年度より研究班でも独自に全国規模での試料提供可能な施設のリスト作りを行い、積極的な資料収集を行っている。その結果、本年度も昨年度と同様 505 という多くのサンプル供与を受けることが出来た。またこれまでの極めて短期間でのサンプル収集ではなく募集期間を長くしたこと、さらに各班員を通して通年でのサンプル収集とスクリーニング試験の実施を行う体制を整えたことにより、従来よりもはるかに広範で合理的なスクリーニング研究体制が構築できたものと思われる。さらにこの方法により、本研究班員とサンプル提供者との間に個人的な繋がりが出来、ある意味では共同研究的な要素が芽生え、活性を持つ薬剤が見出された場合はその物質に焦点を絞って精製を進めることや、由来となった天然物の他の部位や近縁種得から得られたサンプルについての提供を依頼すること等により、系統的に研究を進めることが可能となった。単なるランダムなサンプル収集ではあり得なかった有望なサンプルの開発に繋がる方法である。

1 企業、7 大学及び 2 国公立研究所から寄せられた合計 505 サンプルについて抗

HIV 活性スクリーニングを行った結果、マイクロプレート法では 5 サンプルに、またマクロファージ好性ウイルスの増殖抑制においても同じく 27 サンプルに活性が見られた。それらの中で、両方に対して活性を示したサンプルは 4 サンプルであった。マイクロプレート法での陽性サンプルの中で最も強い活性を示したものは 0.8 $\mu\text{g}/\text{ml}$  で有効であり、マクロファージ好性ウイルスに対しても抗ウイルス作用を示し、また毒性が非常に弱いことから医薬品応用への期待が持たれる。一方、マクロファージ好性ウイルスの増殖を抑制した 27 検体のうち 9 件はその抑制濃度が 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$  以下と強い抗ウイルス作用を示した。興味深いことに  $\text{IC}_{50}$  が 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$  以下という強い抗ウイルス効果を示した 2 件 (No. 5109, 5110) を含めて 23 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 23 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る。

表 1 にも示したように、今回テストした物質の多くは天然由来物質であり、しかも一部を除いてはほとんどが単に抽出しただけのもので、まったく未精製のものであることを考えれば、今後精製を進めることにより、非常に活性の強い抗エイズ物質が得られることが大いに期待される。

現在、耐性株の問題、多剤併用療法の観点からも、新しい作用点を持つ化合物が求められている。我々の研究班での未知物質の探索は、その意味でも新規作用機作を有する化合物を見いだすことが期待されるも

のである。実際昨年度の陽性サンプルの中には、新規性が期待させる化合物も見いだされている。今年度の研究において捕まった多くの陽性化合物につき、今後さらに詳細な作用機作を解明すると共に、化学的な検討を加えることにより、創薬への発展が大いに期待される。

本研究は、特許などの関係で詳細な研究を公表することは、参加企業側の要請とヒューマンサイエンス振興財団との話し合いにより差し控えることとなっている。従って、本研究成果の発表についても、抗 HIV 活性陽性物質の化学名等の情報提供には制限があり、不本意ながらきわめて限定された結論しか紹介できない。本研究班の本来の研究は行政ニーズから発生したこともあり、スクリーニングに限られてきた。しかし研究班の質的変換を行ったことで、今回のように有望な物質が得られた場合は、サンプル提供者との協議のもと、詳細な作用メカニズムの検討、臨床分離株への応用等の研究を進展させることが可能となる。実際、陽性サンプル提供者の中には本研究班との共同研究を望む研究者も増えつつあり、その意味でこの研究班が機能的に動き出したという実感と共に、創薬への研究推進が大いに期待される。

## E. 結 論

1 企業、7 大学及び 2 国公立研究所から寄せられた合計 505 サンプルについて抗 HIV 活性スクリーニングを行った結果、マイクロプレート法では 5 サンプルに、またマクロファージ好性ウイルスの増殖抑制においては 27 サンプルと、延べ 32 もの多くの物質に活性が認められた。活性自体もかなり

強いこと、多くは天然由来の粗抽出物であること、さらに新規作用機作をうかがわせる化合物も得られたことから、創薬への発展が大いに期待される。また、いくつかの

新規スクリーニング方法の開発研究、及び耐性ウイルス研究を推進した。

## F. 研究発表

### 論文発表

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.* 76, 16-23, 2005
2. Mutsuga M, Kawamura Y, Sugita-Konishi Y, Hara-Kudo Y, Takatori K, Tanamoto K. Migration of formaldehyde and acetaldehyde into mineral water in polyethylene terephthalate (PET) bottles. *Food Addit Contam.* 23, 212-218, 2006
3. Muroi M & Tanamoto K. Lipid A and its precursor lipid IVa require different region of mouse MD-2 molecule to induce Toll-like receptor 4-mediated NF- $\kappa$ B activation. *J. Biol. Chem.* 2006
4. Mutsuga M, Tojima T, Kawamura Y, Tanamoto K. Survey of formaldehyde, acetaldehyde and oligomers in polyethylene terephthalate food-packaging materials. *Food Addit. Contam.* 2005 22(8):783-789.
5. Kawasaki Y., Kubota T., Yomota T. & Tanamoto K. Determination of sodium chlorite in processed herring roe by CD-ion chromatography with a conductivity detector. *J. Food Hyg. Soc. Japan*, 46, 161-164, 2005
6. Ohkado Y., kawamura Y., Mutsuga M., Tamura H & Tanamoto K. Analysis of formaldehyde and oligomers in recycled polyethylene terephthalate. *J. Food Hyg. Soc. Japan*, 46, 218-223, 2005.
7. Tada A., Kin Z-L., Sugimoto N., Sato K., Yamazaki T. & Tanamoto K. Analysis of the constituents in Jojoba Wax, a natural gum base, by GC/MS and LC/MS/MS. *J. Food Hyg. Soc. Japan*, 46, 198-204, 2005
8. Ohkado Y., kawamura Y., Mutsuga M., Tamura H & Tanamoto K. Metals in recycled terephthalate and discrimination method for its use. *J. Food Hyg. Soc. Japan*, 46, 109-115, 2005.
9. Shimomura-Shimizu M., Sugiyama K., Muroi M. & Tanamoto K. Alachlor and Carbaryl suppress lipopolysaccharide-induced iNOS expression by inhibiting NH- $\kappa$ B activation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 332, 793-799, 2005
10. 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.

11. Iso T, Sugimoto N., Sato K., Yamazaki T, Ishibashi K., Shiomi S. & Tanamoto K. Identification Test of Alo extract from Aloe arborescens, a natural thickening stabilizer. *Jpn. J. Food Hyg. Chem.*, 12(1), 23-27, 2005
12. Ohkado Y, kawamura Y, Mutsuga M., Tamura H & Tanamoto K. Analysis of Residual volatiles in recycled polyethylene terephthalate. *J. Food Hyg. Soc. Japan*, 46, 13-20, 2005.
13. Jin Z-L., Tada A., Sugimoto N., Sato K., Yamazaki T. & Tanamoto K. Constituents of Fish Scale Foil, a natural Food Colorant. *Jpn. J. Food Chem.* 12(2), 85-87, 2005
14. 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
15. Huy TT, Ishikawa K, Ampofo W, Izumi T, Nakajima A, Ansah J, Tetteh JO, Nii-Trebi N, Aidoo S, Ofori-Adjei D, Sata T, Ushijima H, Abe K. Characteristics of hepatitis B virus in Ghana: full length genome sequences indicate the endemicity of genotype E in West Africa. *J Med Virol.* 2006 Feb;78(2):178-84.
16. Khamrin P, Peerakome S, Wongsawasdi L, Tonusin S, Sornchai P, Maneerat V, Khamwan C, Yagyu F, Okitsu S, Ushijima H, Maneekarn N. Emergence of human G9 rotavirus with an exceptionally high frequency in children admitted to hospital with diarrhea in Chiang Mai, Thailand. *J Med Virol.* 2006 Feb;78(2):273-80.
17. Huy TT, Ushijima H, Sata T, Abe K. Genomic characterization of HBV genotype F in Bolivia: genotype F subgenotypes correlate with geographic distribution and T(1858) variant. *Arch Virol.* 2006 Mar;151(3):589-97.
18. Akihara S, Phan TG, Nguyen TA, Yagyu F, Okitsu S, Muller WE, Ushijima H. Identification of sapovirus infection among Japanese infants in a day care center. *J Med Virol.* 2005 Dec;77(4):595-601.
19. Yoshinaga M, Phan TG, Nguyen TA, Yan H, Yagyu F, Okitsu S, Muller WE, Ushijima H. Changing distribution of group A rotavirus G-types and genetic analysis of G9 circulating in Japan. *Arch Virol.* 2006 Jan:183-192
20. Hansman GS, Natori K, Ushijima H, Katayama K and Takeda H, Characterization of polyclonal antibodies raised against five virus-like particles, *Arch Virol.*, 150, 1433-7, 2005
21. Oka T, Katayama K, Ogawa S, Hansman GS., Kageyama T, Ushijima H, Miyamura T, and Takeda N. Proteolytic processing of sapovirus ORF1 polyprotein. *J Virol.*, 79(12), 7283-7290, 2005
22. Hansman GS, Kuramitsu M, Yoshida H, Katayama K, Takeda N, Ushijima H, Surenkhand G, Gantolga D, Kuroiwa C. Viral gastroenteritis in Mongolian infants. *Emerg Infect Dis* 11(1): 180-182, 2005
23. Hansman GS, Natori K, Oka T, Ogawa S, Tanaka K, Nagata N, Ushijima H, Takeda N, Katayama K. Cross-reactivity among sapovirus recombinant capsid proteins. *Arch Virol*, 150(1), 21-36, 2005

24. Phan TG, Nguyen TA, Shimizu H, Yagyu F, Okitsu S, Muller WE, Ushijima H. Related Identification of enteroviral infection among infants and children admitted to hospital with acute gastroenteritis in Ho Chi Minh City, Vietnam. *J Med Virol.* 2005 Oct;77(2):257-64.
25. Akihara S, Phan TG, Nguyen TA, Hansman G, Okitsu S, Ushijima H. Existence of multiple outbreaks of viral gastroenteritis among infants in a day care center in Japan. *Arch Virol.* 2005 Oct;150(10):2061-75.
26. Phan TG, Nguyen TA, Kuroiwa T, Kaneshi K, Ueda Y, Nakaya S, Nishimura S, Nishimura T, Yamamoto A, Okitsu S, Ushijima H. Viral diarrhea in Japanese children: results from a one-year epidemiologic study. *Clin Lab.* 2005;51(3-4):183-91.
27. Phan TG, Nguyen TA, Nishimura S, Nishimura T, Yamamoto A, Okitsu S, Ushijima H. Etiologic agents of acute gastroenteritis among Japanese infants and children: virus diversity and genetic analysis of sapovirus. *Arch Virol.* 2005 Jul;150(7):1415-24.
28. Li L, Phan TG, Nguyen TA, Kim KS, Seo JK, Shimizu H, Suzuki E, Okitsu S, Ushijima H. Molecular epidemiology of adenovirus infection among pediatric population with diarrhea in Asia. *Microbiol Immunol.* 2005;49(2):121-8.
29. Yan H, Abe T, Phan TG, Nguyen TA, Iso T, Ikezawa Y, Ishii K, Okitsu S, Ushijima H. 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.* 2005 Mar;75(3):475-81.
30. Phan TG, Nguyen TA, Yan H, Okitsu S, Ushijima H. 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.* 2005 Jun;150(6):1175-85.
31. Phan TG, Okame M, Nguyen TA, Nishio O, Okitsu S, Ushijima H. Genetic diversity of sapovirus in fecal specimens from infants and children with acute gastroenteritis in Pakistan. *Arch Virol.* 2005 Feb;150(2):371-7.
32. Roy BB, Jinno-Oue A, Shinagawa M, Shimizu A, Tamura K, Shimizu N, Tanaka A, and Hoshino H. Isolation of the feline alpha1,3-galactosyltransferase gene, expression in transfected human cells and its phylogenetic analysis. *J. Exp. Zool. B Mol. Dev. Evol.* 2005, 306B, 59-69.
33. Shimizu, Y., Okoba, M., Yamazaki, N., Goto, Y., Miura, T., Hayami, M., Hoshino, H. and Haga T. Construction and in vitro characterization of a chimeric simian and human immunodeficiency virus with the RANTES gene. *Microbes Infect.* (in press)
34. Saha, M. N., Tanaka, A., Jinno-Oue, A., Shimizu, N., Tamura, K., Shinagawa, M., Chiba, J., and Hoshino H. Formation of vesicular stomatitis virus pseudotypes bearing surface proteins of hepatitis B virus. *J. Virol.* 2005, 79, 12566-12574.
35. Jinno-Oue A, Shimizu N, Soda Y, Tanaka A, Ohtsuki T, Kurosaki D, Suzuki Y, and Hoshino H. The synthetic peptide derived from the NH2-terminal extracellular region of an orphan G protein-coupled receptor, GPR1, preferentially inhibits infection of X4 human immunodeficiency virus type 1. *J. Biol. Chem.* 2005, 280, 30924-30934.

36. 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
37. Toru Otake, Takuya Kawahata, Haruyo Mori, Yoko Kojima, Kiyoshi Hayakawa, Novel method of inactivation of human immunodeficiency virus type 1 by the freeze pressure generation method, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 67, 746-751, 2005
38. 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* 124, 157-165 (2005)
39. "M46I amino acid mutation of HIV-1 protease damages viral replicative fitness as well as L90M mutation: Assessment by a novel quantitative SNP-detection method" (投稿中)
40. Characterization of Various Recombinant Antigens from *Echinococcus multilocularis* for Use in the Immunodiagnosis. Kouguti H, Suzuki T, Yamano K, Honma H and Sawada Y. *The Protein Journal*, 24, 57-64 (2005)
41. 長島真美、貞升健志、新開敬行、秋場哲哉、吉田 勲、吉田靖子、矢野一好、甲斐明美、諸角 聖、東京都における HIV 検査成績(1999年-2004年)、東京都健康安全研究センター一年報、56,2005 (印刷中)
42. Sasaki Y, Kai A, Hayashi Y, Shinkai T, Noguchi Y, Hasegawa M, Sadamasu K, Mori K, Tabei Y, Nagashima M, Morozumi S, Yamamoto T. Multiple Viral Infections and Genomic Divergence among Noroviruses during an Outbreak of Acute Gastroenteritis. *J Clin Microbiol.* 44,790-797,2006

#### 学会発表

1. 第7回アジア・太平洋地域エイズ国際会議 2005年 Molecular Epidemiology of HIV-1 among children in Vietnam and developing subtype CRF01\_AE specific primers for PCR. Yagyū F, Trinh DQ, Nguyen AT, Okitsu S, Hoang TK, Tanamoto K, Ushijima H
2. 第53回 日本ウイルス学会 2005年 「ベトナムにおける HIV 感染妊婦から生まれた児の HBV・HCV の検出」 F. Yagyū, Q.D. Trinh, T.A. Nguyen, S. Okitus, H. Ushijima
3. 第19回 日本エイズ学会 2005年 「ベトナムにおける HIV 母子感染の分子疫学」 F. Yagyū, Q.D. Trinh, H. Ushijima
4. 清水宣明、大上厚志、田中淳、大槻貴博、武部豊、草川茂、森隆久、山口華代、中谷陽子、星野洪郎. アミノ末端領域にチロシンを持つ様々な GPCR の HIV/SIV コレセプター活性の解析. 第19回日本エイズ学会学術集会(熊本) 2005年12月1-3日
5. 清水宣明、大上厚志、田中淳、大槻貴博、和田成一、森隆久、山口華代、星野洪郎. HIV-1 感染感受性に及ぼす重粒子線の効果の解析. 第53回日本ウイルス学会学術集会(横浜) 2005年11月20-22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53回日本ウイルス学会学術集会 (横

浜) 2005年11月21-22日

7. 清水宣明、大上厚志、田中淳、大槻貴博、和田成一、森隆久、山口華代、星野洪郎. HIV-1 感染感受性に及ぼす重粒子線の効果の解析. 21st Century COE program. The 2nd International Symposium on Biological Research using Accelerator Technology (前橋) 2005年11月10-11日
8. 大上厚志、清水宣明、田中 淳、大槻貴博、星野洪郎: ヒト脳微小血管に由来する内皮細胞と周皮細胞の共存培養系を用いた HIV-1 感染試験 第19回日本エイズ学会学術集会 (熊本), 2005年12月1-3日
9. Oue A, Shimizu N, Tanaka A, Ohtsuki T, Shinagawa M, Mori T, Nakamura T, Yamaguchi K, Nakatani Y, Saha NM, Hoque ASK, Shimizu A, Ishikawa O, Wada S, Funayama T, Kobayashi Y, Hoshino N. Effect of heavy-ion irradiation on the expression of cellular and viral genes involved in the replication of human retroviruses. The second international symposium on biomedical research using accelerator technology (Maebashi, Japan November 10-11, 2005)
10. 川畑拓也、小島洋子、森 治代、大竹 徹, STI クリニックにおける HIV 感染のモニタリング, 第22回大阪 STI 研究会、大阪、2005
11. 森 治代、小島洋子、川畑拓也、大竹 徹, 未治療感染者から検出された V108I 変異が非核酸系逆転写酵素阻害剤耐性獲得に及ぼす影響, 第19回近畿エイズ研究会、京都、2005
12. 小島洋子、川畑拓也、森 治代、大竹 徹, Dual infection of 2 distinct HIV-1 subtype B, 第7回アジア・太平洋地域エイズ国際会議、神戸、2005
13. 森 治代、小島洋子、川畑拓也、大竹 徹, Influence of V108I mutation in a treatment-naïve HIV-1-infected patient on the development of NNRTI-resistance, 第7回アジア・太平洋地域エイズ国際会議、神戸、2005
14. "Presence of drug-resistance-associated mutations in HIV-1 clade C- infected patients in India" Naohiko Yamamoto et al. The 7th International Congress on AIDS in Asia and the Pacific (ICAAP), (2005.07.02)
15. Persistence of protease inhibitor resistant HIV-1 in therapy naïve patients; T. Kaneda, S. Ibe, K. Sawaki, T. Morishita, U. Shigemitsu, N. Mamiya and M. Hamaguchi. (2nd International Workshop on HIV Persistence during Therapy Saint Martin, FWI, December 6-9, 2005)
16. 「 B、CRF01 AE を含む複数のサブタイプの HIV-1 定量法の確立」 水野善文、永井裕美、加堂真由、渡辺朝子、森下高行、山本直彦、伊部史朗、重見 麗、藤崎誠一郎、稲田頼太郎、金田次弘 (第19回日本エイズ学会総会 平成17年12月-2005)。
17. 貞升健志、秋場哲哉、新開敬行、長島真美、吉田 勲、吉田靖子、甲斐明美、諸角 聖、東京都における HIV 検査の状況、衛生微生物協議会第26回研究会、福井、2005
18. 貞升健志、長島真美、新開敬行、秋場哲哉、甲斐明美、諸角 聖、東京都内で検出された HIV-1 の Protease および Reverse Transcriptase 遺伝子の解析、第19回日本エイズ学会、熊本、2005

## G. 知的所有権の取得状況

### 1. 特許取得

特許出願

[発明の名称] 新規な抗ウイルス剤

[発明者] 棚元憲一（国立医薬品食品衛生研究所）牛島廣治（東京大学大学院）

吉田尚之（チッソ石油化学株式会社）石田和史（チッソ石油化学株式会社）

### 2. 新案登録

なし

### 3. その他

なし

表1. 平成17年度スクリーニング研究で見いだされた抗HIV活性物質

サンプル	由来	MT-4		MAGIC 5 IC50
		細胞障害抑制有効濃度 ( $\mu\text{g/ml}$ )	細胞毒性 ( $\mu\text{g/ml}$ )	
05001	合成品	NE	62.5	0.0065
05002		NE	62.5	0.042
05003		NE	15.6	0.2
05004		NE	125	0.00046
05023	植物	NE	62.5	5.5
05038	藍藻	3.9	250	2.2
05045	植物	NE	500	35.0
05049		NE	500	73.0
05073	キノコ	NE	500	53.0
05088	植物	NE	125	3.9
05090		NE	250	9.8
05091		NE	125	17.0
05092		NE	500	17.5
05093		NE	500	48.0
05094		NE	62.5	6.3
05095		NE	62.5	4.4
05100		NE	500	52.0
05103		NE	125	7.9
05104		10.0	630	14.5
05105		10.0	630	14.5
05109		NE	125	1.7
05110		NE	125	1.9
05186		NE	125	20.5
05193		NE	62.5	13.5
05204	62.5	250	NE	
05207	NE	31.3	5.0	
05221	NE	2.0	0.47	
05229	NE	31.3	8.0	
05239	NE	125	22.1	
05368	NE	500	59.7	
05371	NE	250	61.4	
05505	合成品	0.8	100	15.5
TAC779				0.08 $\mu\text{M}$

# 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研究事業） 分担研究報告書

## エイズおよび関連する新興・再興ウイルス感染症の 医薬品候補物質のスクリーニングと新薬開発に向けた研究

所属：東京大学大学院 医学系研究科 発達医科学教室

分担研究者：教授 牛島廣治

協力者：沖津祥子、柳生文宏

### 研究要旨

平成17年度送られてきた47サンプルについてMT-4細胞のHIV(HTLV-III B)感染による細胞傷害性抑制試験でスクリーニングを行った。5サンプルが細胞傷害抑制を示した。直腸癌細胞であるCaCo-2細胞に、CD4、およびコレセプターとして考えられている18種類の共役型GプロテインレセプターのmRNAの発現の有無を調べたところCaCo-2において、C5a receptor、CCR1、CCR7、CCR9、CXCR3、CXCR4、CXCR5、RDC1の8種類のmRNAの発現が確認された。

### A. 研究目的

#### A-1. 細胞傷害抑制試験による抗 HIV 薬のスクリーニング

平成17年度送られてきた47サンプルについてMT-4細胞のHIV(HTLV-III B)感染による細胞傷害性抑制試験でスクリーニングを行った。

#### A-2. 大腸癌細胞に発現するGタンパクレセプター

日本では同性間の性的接触による HIV 感染は増加の一途をたどっている。厚生労働省 HIV 研究班の報告によると、同性間の性的接触の感染様式全体の中での比率は、平成 16 年の統計で 60.0%となっている。また同様に、平成 15 年は 55.6%、平成 14 年は 53.6%と、年々比率が増加していることが伺える。感染が起こるためには、主要レセプターである CD4、かつコレセプターと呼ばれる主要レセプターに付属するものの2つのレセプターが必要である。そして最近、いくつかの共役型 G プロテインレセプターが HIV のコレセプターとなること

が発見され注目されている。そこで直腸感染の可能性を *in vitro* のレベルで検討するために、直腸癌細胞である CaCo-2 細胞に、CD4、およびコレセプターとして考えられている 18 種類の共役型 G プロテインレセプターの mRNA の発現の有無を調べた。

### B. 研究方法

#### B-1. 細胞傷害抑制試験による抗 HIV 薬のスクリーニング

スクリーニングは抗 HIV 物質の細胞毒性と抗 HIV 活性を測定するプレートの2種類のプレートを用意した。両プレートとも96穴平底培養プレートを使用し、左端8穴に10%FCS加RPMI1640培地で所定の濃度に希釈した試料溶液200 $\mu$ lを加えた。残りの穴には培地を100 $\mu$ lずつ入れ、左端の穴から8連ピペットで100 $\mu$ lで2階段階希釈を11穴まで行い、12穴目は薬剤濃度を0として細胞増殖およびHIV感染のコントロールとした。

被検薬剤 1 種類につき細胞毒性と抗 HIV 活性測定プレートのそれぞれ 2 列を使用した。被検薬剤を希釈したプレートに 1 プレート辺り  $2 \times 10^6$  の多数増殖期にある MT-4 細胞を遠心分離により集め、細胞毒性測定用のプレートには培地 10 ml で再浮遊し 100  $\mu$ l すべての穴に加えた。一方、抗 HIV 活性測定プレートには遠心分離により集めた  $2 \times 10^6$  の MT-4 細胞に 100TCID<sub>50</sub> となるように HIV (HTLV-III<sub>B</sub>) のストック溶液を加え、37°C 1 時間感染させた後、培地 10 ml で再浮遊し抗 HIV 活性測定プレートのすべての穴に 100  $\mu$ l 加えた。培養 5 日目に顕微鏡により HIV による細胞変性効果 (CPE) と細胞毒性を観察した。

以上の結果は試験判定記録用紙に記載した。

#### B-2. 大腸癌細胞に発現する Gタンパクレセプター

CaCo-2 から、RNA 抽出キット (RNeasy Mini Kit; QIAGEN) を用いて total RNA の抽出を行った。DNase 処理を行った後、RT-PCR により、目的とする遺伝子の増幅反応を行った。PCR 法の際に用いられたプライマーは以下の表の通りである (表 1)。

### C. 研究結果

#### C-1. 細胞傷害抑制試験による抗 HIV 薬のスクリーニング

スクリーニングの結果は、47 サンプルのうち 5 サンプルが抗 HIV 活性を示した。測定濃度は最大有効濃度から 5 倍段階希釈により実施した。その結果、サンプル 05001, 05002, 05003, 05004, 050038 はそれぞれ IC<sub>100</sub> は 0.013  $\mu$ g/ml, 0.32  $\mu$ g/ml, 0.16  $\mu$ g/ml, 0.0026  $\mu$ g/ml, 3.9  $\mu$ g/ml であった。

#### C-2. 大腸癌細胞に発現する Gタンパクレセプター

18 種類の G プロテインレセプターのうち、C5a receptor, CCR1, CCR7, CCR9, CXCR3, CXCR4, CXCR5, RDC1 の 8 種類

の mRNA が CaCo-2 において発現されていることが確認された。また、その他の G プロテインレセプター、および CD4 の mRNA の発現は確認できなかった。

### D. 考察

#### D-1. 細胞傷害抑制試験による抗 HIV 薬のスクリーニング

5 つのサンプルは細胞傷害抑制試験において効果があり、またウイルスのエントリーを阻害していると思われる。

#### D-2. 大腸癌細胞に発現する Gタンパクレセプター

今まで CaCo-2 において C5a receptor, CCR1, CCR7, CCR9, CXCR3, CXCR5, RDC1 の mRNA 発現は確認されていなかったが、今回の研究において初めて発現を確認した。これらのうち CCR9, CXCR4, RDC1 は先行研究から既に HIV のコレセプターとして機能することが確認されている。また、今回発現量を半定量的に調べたところ、RDC1 の発現量が高かったことから HIV のエントリーに働く可能性がある。一方、HIV の主要レセプターである CD4 の mRNA 発現は確認されなかった。従来 の先行研究でも、CaCo-2 では CD4 の mRNA 発現は確認されていない。そのため、直腸感染では CD4 以外の未知の主要レセプターが関与する可能性がある。

### E. 結論

#### E-1. 細胞傷害抑制試験による抗 HIV 薬のスクリーニング

5 サンプルがウイルスのエントリーを阻害することにより抗 HIV 活性を示していると思われる。

#### E-2. 大腸癌細胞に発現する Gタンパクレセプター

CaCo-2 において、C5a receptor, CCR1, CCR7, CCR9, CXCR3, CXCR4, CXCR5,

RDC1の8種類のmRNAの発現が確認された。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 研究発表

### 学会発表

1: 第7回アジア・太平洋地域エイズ国際会議 2005年 Molecular Epidemiology of HIV-1 among children in Vietnam and developing subtype CRF01\_AE specific primers for PCR. Yagyu F, Trinh DQ, Nguyen AT, Okitsu S, Hoang TK, Tanamoto K, Ushijima H

2: 第53回 日本ウイルス学会 2005年 「ベトナムにおける HIV 感染妊婦から生まれた児の HBV・HCV の検出」 F. Yagyu, Q.D. Trinh, T.A. Nguyen, S. Okitus, H. Ushijima

3: 第19回 日本エイズ学会 2005年 「ベトナムにおける HIV 母子感染の分子疫学」

F. Yagyu, Q.D. Trinh, H. Ushijima

### 論文発表

1: Huy TT, Ishikawa K, Ampofo W, Izumi T, Nakajima A, Ansah J, Tetteh JO, Nii-Trebi N, Aidoo S, Ofori-Adjei D, Sata T, Ushijima H, Abe K. Characteristics of hepatitis B virus in Ghana: full length genome sequences indicate the endemicity of genotype E in West Africa. J Med Virol. 2006 Feb;78(2):178-84.

2: Khamrin P, Peerakome S, Wongsawasdi L, Tonusin S, Sornchai P, Maneerat V, Khamwan C, Yagyu F, Okitsu S, Ushijima H, Maneekarn N. Emergence of human G9 rotavirus with an exceptionally high

frequency in children admitted to hospital with diarrhea in Chiang Mai, Thailand. J Med Virol. 2006 Feb;78(2):273-80.

3: Huy TT, Ushijima H, Sata T, Abe K. Genomic characterization of HBV genotype F in Bolivia: genotype F subgenotypes correlate with geographic distribution and T(1858) variant. Arch Virol. 2006 Mar;151(3):589-97.

4: Akihara S, Phan TG, Nguyen TA, Yagyu F, Okitsu S, Muller WE, Ushijima H. Identification of sapovirus infection among Japanese infants in a day care center. J Med Virol. 2005 Dec;77(4):595-601.

5: Yagyu F, Okitsu S, Tanamoto K, Ushijima H. Determination of HIV-1 subtypes (A-D, F, G, CRF01\_AE) by PCR in the transmembrane region (gp41) with novel primers. J Med Virol. 2005 May;76(1):16-23.

6: Phan TG, Nguyen TA, Shimizu H, Yagyu F, Okitsu S, Muller WE, Ushijima H. Related Identification of enteroviral infection among infants and children admitted to hospital with acute gastroenteritis in Ho Chi Minh City, Vietnam. J Med Virol. 2005 Oct;77(2):257-64.

7: Yoshinaga M, Phan TG, Nguyen TA, Yan H, Yagyu F, Okitsu S, Muller WE, Ushijima H. Changing distribution of group A rotavirus G-types and genetic analysis of G9 circulating in Japan. Arch Virol. 2006 Jan:183-192

8: Akihara S, Phan TG, Nguyen TA, Hansman G, Okitsu S, Ushijima H. Existence of multiple outbreaks of viral gastroenteritis among infants in a day care center in Japan. Arch Virol. 2005 Oct;150(10):2061-75.

- 9: Phan TG, Nguyen TA, Kuroiwa T, Kaneshi K, Ueda Y, Nakaya S, Nishimura S, Nishimura T, Yamamoto A, Okitsu S, Ushijima H. Viral diarrhea in Japanese children: results from a one-year epidemiologic study. *Clin Lab.* 2005;51(3-4):183-91.
- 10: Phan TG, Nguyen TA, Nishimura S, Nishimura T, Yamamoto A, Okitsu S, Ushijima H. Etiologic agents of acute gastroenteritis among Japanese infants and children: virus diversity and genetic analysis of sapovirus. *Arch Virol.* 2005 Jul;150(7):1415-24.
- 11: Li L, Phan TG, Nguyen TA, Kim KS, Seo JK, Shimizu H, Suzuki E, Okitsu S, Ushijima H. Molecular epidemiology of adenovirus infection among pediatric population with diarrhea in Asia. *Microbiol Immunol.* 2005;49(2):121-8.
- 12: Yan H, Abe T, Phan TG, Nguyen TA, Iso T, Ikezawa Y, Ishii K, Okitsu S, Ushijima H. 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.* 2005 Mar;75(3):475-81.
- 13: Phan TG, Nguyen TA, Yan H, Okitsu S, Ushijima H. 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.* 2005 Jun;150(6):1175-85.
- 14: Phan TG, Okame M, Nguyen TA, Nishio O, Okitsu S, Ushijima H. Genetic diversity of sapovirus in fecal specimens from infants and children with acute gastroenteritis in Pakistan. *Arch Virol.* 2005 Feb;150(2):371-7.

H. 知的財産権の出願・登録状況  
なし