

厚生労働科学研究費補助金

政策創薬総合研究事業

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18年度 総括・分担研究報告書

主任研究者

棚元 憲一

平成19(2007)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18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
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		課長補佐
齋藤 隆行	神奈川県衛生研究所	微生物部	専門研究員
澤田 幸治	北海道立衛生研究所		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	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

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
Trinh Duy Quang	東京大学大学院医学系研究科
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
吉田 靖子	東京都健康安全研究センター
山田 澄夫	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
清水 宣明	群馬大学大学院医学系研究科
大槻 貴博	群馬大学医学部

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・・・・22
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・・・・25
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・・・・29
石崎 徹
5. エイズ医薬品候補物質のスクリーニング研究・・・・・・・・・・・・31
貞升 健志
6. エイズ医薬品候補物質のスクリーニング研究・・・・・・・・・・・・35
齋藤 隆行
7. 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・・・・36
澤田 幸治
8. エイズ医薬品候補物質のスクリーニング研究・・・・・・・・・・・・38
野口 有三
9. 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・・・・40
大竹 徹
10. 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・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・46
山本 直彦
11. スクリーニング法の開発、作用メカニズムの解明・・・・・・・・・・・・51
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（政策創薬総合研究事業）

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 柵元憲一 国立医薬品食品衛生研究所食品添加物部部長

研究要旨：2 企業、6 大学及び 1 国公立研究所から寄せられた合計 322 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 29 サンプルと、延べ 34 の物質に活性が認められた。加えて、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で約 200 サンプルの抗 HIV 活性を調べ、6 サンプルについて抗 HIV-1 活性を見いだすとともに、ファーストスクリーニングとして大量のサンプル処理に適していることを確認した。また昨年度の陽性サンプルについて、セコンドレセプターへの作用、逆転写酵素阻害活性、巨細胞形成等の作用機作の検討を行った。

分担研究者

澤田 幸治	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
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'-deoxy-thymidine)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 μ 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 2×10^6 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 μ 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 2×10^6 のMT-4細胞に100TCID₅₀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 μ 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: ウェルあたり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 μ lになるようにDEAE-dextran添加培養液で調整し加える。37°CのCO₂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 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 μ lを加える。培地に懸濁した持続感染Molt-4/HIV細胞浮遊液 1×10^6 個/mlを250 μ l/well加え、さらに非感染Molt-4細胞浮遊液 1×10^6 個/mlを250 μ l/well加え、攪拌し、CO₂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。

今年度は加えて昨年度本研究班で開発した新規の簡易スクリーニング法である細胞融合陽性試験により抗HIV-1活性の測定を行った。

d) 薬剤による細胞融合抑制試験: N4R5/GFP細胞あるいはN4X4/GFP細胞25,000個を250 μ lの培地に浮遊させ、24-well plateの各wellに播種し、翌日HeLaKS386細胞あるいはHeLa/M-env/Tat細胞25,000、5,000、1,000、200、40、8個を250 μ lの培地に浮遊させ上層した。6、12、24時間後にGFP陽性の合胞体を観察した。合胞体形成に対する薬剤の効果は、以下の手順で検討した。

N4R5/GFP 細胞および N4X4/GFP 細胞 12,500 個を 250 μ l の培地に浮遊させ、48-well plate の各 well に播種し、翌日 TAK-779 あるいは AMD3100 を、10%FBS を含む EMEM 培地で段階希釈して 50 μ l ずつ各 well に加えた。37°C で 1 時間後、HeLa/M-env/Tat 細胞 あるいは HeLaKS386 細胞を GFP 陽性合胞体が 1well あたり 200 個出る細胞数に希釈して 200 μ l 上層した。37°C で 1 日培養後、GFP 陽性合胞体数をカウントし、薬剤を添加していない対照の混合培養の GFP 陽性合胞体数と比較し、合胞体形成を 50%抑制する濃度 (IC₅₀) を算出した。

(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：

CCR5 および CXCR4 分子への作用：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。

逆転写酵素阻害作用：CAVIDI 社の Lenti RT Activity Kit を用いて測定した。手技、及び判定基準は添付のマニュアルに従った。

薬剤耐性感染性クローンの作成

HXB2・RT M18V 感染性クローンは pSUM8 plasmid を用いて、RT gene の codon 184 の ATG を GTG に site-directed mutagenesis により作成した。また、HXB2・RT T215Y 感染性クローンは、同様に pSUM8 plasmid を用いて、RT gene の codon 215 の ACC を TAC に変換し、作成した。HXB2・RT K103N 感染性クローンは、同様に pSUM8 plasmid を用いて、RT gene の codon 103 の AAA を TAC 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

2 企業、6 大学及び 1 国公立研究所から寄せられた合計 322 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、29 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-5 アッセイ両方に活性を示したものは 2 サンプルのみであり、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 0.78 μ g/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 IC₅₀ が 0.001 μ g/mL という強い抗ウイルス効果を示したものがあつた。総体的にいずれの陽性サンプルもある程度の細胞毒性が見られたが、そのほとんどが選択性 10 以上を示し、中には約 70 というものもあつた。

一方、昨年度までに開発した HIV-1 の感染を簡便かつ迅速に検出可能で、また感染経過を経時的に観察できる GFP 発現を指標としたスクリーニング法用い、新規の核酸関連化合物 50 種類、デアザフラビン類および類縁化合物 142 種類について、抗 HIV-1 活性および細胞毒性を検討した。この結果、デアザフラビン類および類縁化合物 142 種類(のうち 6 種類の薬剤で抗 HIV-1 活性を有したものが検出された。これらの薬剤のうち 4 サンプルが選択性指数 5 以上を示した。

活性物質の作用機作研究

昨年度のスクリーニング試験において強い抗 HIV 活性を示した 8 種の検体についてその抗 HIV 作用メカニズムを検討した。8 種の検体のうち 5 種はマクロファージ好性 HIV-1 のみを、残りの 3 種は T 細胞好性ウイルスの増殖も抑制したものであった。8 種の検体は 1 種を除いて、細胞と抗 CCR5 モノクローナル抗体の結合を強く抑制したが、細胞と抗 CXCR4 モノクローナル抗体の結合の抑制は見られなかった(表 2)。これらのことから、これらの検体は HIV-1 のセコンドレセプターである CCR5 分子に作用することにより抗ウイルス効果を示したことが示唆された。また、これらの薬剤の感染後期(持続感染系)における効果はすべて、細胞毒性のない最大濃度においても巨細胞の形成の抑制はみられなかった。さらに、逆転写酵素阻害活性を検討したところ、7 件中 4 件には阻害活性は認められなかったが、3 件については阻害活性が認められ、その IC_{50} 値(50%阻害濃度)はそれぞれ、 $513.5\mu\text{g/ml}$ 、 $16.9\mu\text{g/ml}$ 、 $8.5\mu\text{g/ml}$ であった(表 2)。

耐性ウイルスに対する研究

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、M184V, T215Y, K103N に変異をもつ耐性感染性クローンを作成した。今回作成した薬剤耐性感染性クローンは、当研究班で見出された抗 HIV 活性をもつ化合物が、従来の薬剤と交差耐性の有無を検討し、臨床上使用されている従来の薬剤にない新規薬剤となりうるかどうかの判定に有用である。

D. 考察

本エイズスクリーニング研究班では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、数年前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きた。その結果、本年度も全体として 5 百を超える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。

本年度は新たに 2 企業、6 大学及び 1 国公立研究所から寄せられた合計 322 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 29 サンプルに活性が見られた。陽性サンプルの中には $1\mu\text{g}/\text{ml}$ でも活性を示すものも多く、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 IC_{50} が $0.001\mu\text{g}/\text{mL}$ という強い抗ウイルス効果を示したものがあつた。実際の応用を考えたとき、サンプルの毒性が問題となるため選択性が重要であるが、多くの有効物質が選択性 10 以上を示し、中には約 70 というものもあつた。また、本研究班では N4R5/GFP 細胞を用いた系で、R5-HIV-1 に対するウイルス感染および細胞間感染をモデルとした抗 HIV-1 剤のスクリーニング法を開発し、今年度はそのスクリーニング法を用いて約 200 サンプルのスクリーニングを行った。検討結果から、このスクリーニング法は、感染初期に重要なマクロファージ指向性の R5-HIV-1 の感染・増殖・複製を阻害する薬剤の簡便かつ迅速なスクリーニングに有用であると考えられる。

今年度の陽性サンプルについて興味深いことは 29 検体中 27 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つたことである。このことはこれら 27 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。HIV 感染症の病期の長期間体

内ではマクロファージ好性ウイルスが多数を占めることが明らかにされているが、今回、多くの検体がマクロファージ好性ウイルスの増殖を強く抑制することが分かり、これらの検体がすぐれたエイズ薬のシードとなる可能性が示された。

一方、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、さらにはもっと毒性の低い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、セコンドレセプターに作用する可能性のあることから新規性を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いても、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

2 企業、6 大学及び 1 国公立研究所から寄せられた合計 322 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 29 サンプルと、延べ 34 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、本研究班で開発した新規スクリーニング法を検証し、ファーストスクリーニングとして大量のサンプル処理に適していることを確認した。また昨年度の陽性サンプルの作用機作の検討、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. Phan TG, Kuroiwa T, Kaneshi K, Ueda Y, Nakaya S, Nishimura S, Yamamoto A, Sugita K, Nishimura T, Yagyu F, Okitsu S, Müller WEG, Maneekarn N, Ushijima H. Changing Distribution of Norovirus Genotypes and Genetic Characterization of Recombinant GIIB among Infants and Children with Diarrhea in Japan. *J Med Virol.* 78(7): 971-978, 2006.
2. Phan TG, Yagyu F, Kozlov V, Kozlov A, Okitsu S, Müller WEG, Ushijima H. Viral gastroenteritis and Genetic Characterization of Recombinant Norovirus among Infants and Children with Diarrhea in Eastern Russia. *Clin Lab* 52 (5-6): 247-253, 2006.
3. Phan TG, Yan H, Li Y, Okitsu S, Müller WEG, Ushijima H. Novel Recombinant Norovirus in China. *Emerg Infect Dis.* 12(5): 857-858, 2006.
4. Phan TG, Okitsu S, Müller WEG, Kohno H, Ushijima H. Identification of Novel Recombinant Sapovirus in Japan. *Emerg Infect Dis.* 12(5): 865-867, 2006.
5. Khamrin P, Maneekern N, Peerakome S, Yagyu F, Okitsu S, Ushijima H. Molecular characterization of a rare G3P[3] human rotavirus reassortant strain reveals an evidence for human-animals multiple interspecies transmissions. *J Med Virol* 78(7):986-994, 2006.
6. 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.* 2006; 8(1):105-13.
7. 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.* 2006, 306: 59-69.
8. K Abe , A Nozaki, K Tamura, M Ikeda, K Naka, H Dansako, H Hoshino, K Tanaka, and N Kato. Tandem repeats of lactoferrin-derived anti-hepatitis C virus peptide enhance antiviral activity in cultured human hepatocytes. *Microbiol Immunol.* 2007, 51: 117-125.
 9. 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
 10. Muroi M. and Tanamoto K. Structural regions of MD-2 that determine the agonist-antagonist activity of lipid IVa. *J. Biol. Chem.* 281, 5484-5491, 2006
 11. Igarashi A., Ohtsu S., Muroi M. and Tanamoto K. Effects of possible endocrine disrupting chemicals on bacterial component-induced activation of NF- κ B. *Biol. Pharm. Bull.* 29, 2120-2122, 2006
 12. 川畑拓也、小島洋子、森 治代、大竹 徹、大國 剛、当所にて HIV 感染を確認した、2例のイムノクロマトグラフィ法陰性の感染初期例、*感染症学雑誌* 81, 76-77, 2007
学会発表
 1. 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
 2. 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
 3. 貞升健志, 長島真美, 新開敬行, 甲斐明美, 諸角聖, 山口 剛, イムノクロマト法で陰性を示した HIV 検査陽性の 2 症例について, 第 80 回日本感染症学会総会, 東京, 2006,
 4. 貞升健志, 長島真美, 新開敬行, 吉田靖子, 山田澄夫, 東京都内で検出された HIV-1 の Protease 遺伝子の解析, 第 20 回日本エイズ学会学術集会・総会, 東京, 2006
 5. 長島真美, 貞升健志, 新開敬行, 吉田靖子, 山田澄夫, イムノクロマト法のロット間差に関する検討, 第 20 回日本エイズ学会学術集会・総会, 東京, 2006
 6. 新開敬行, 貞升健志, 長島真美, 吉田靖子, 山田澄夫, 東京都の HIV 検査におけるイムノクロマト法偽陰性例について, 第 20 回日本エイズ学会学術集会・総会, 東京, 2006
 7. 川畑拓也、小島洋子、森 治代、大竹 徹、大國 剛, HIV 感染に対して感染リスクの高い行動を取る人々を対象にした疫学調査において見つかった、HIV-1 遺伝子陽性である 3 例の感染初期例, 第 20 回近畿エイズ研究会学術集会、大阪、2006
 8. 小島洋子、川畑拓也、森 治代、大竹 徹、大阪府内において HIV 感染に対してり

- スクの高い行動をとる グループ内で広がる HIV-1 の疫学調査, 第 20 回近畿エイズ研究会学術集会、大阪、2006
9. 森 治代、小島洋子、川畑拓也、大竹 徹、V108I polymorphism が EFV 耐性の誘導に及ぼす影響, 第 20 回日本エイズ学会、東京、2006
 10. 川畑拓也、小島洋子、森 治代、大竹 徹、大國 剛, IC 法において陰性を示した 3 例の HIV 感染初期例, 第 20 回日本エイズ学会学術集会、東京、2006
 11. 川畑拓也、小島洋子、森 治代、大竹 徹、大國 剛, HIV 疫学調査における母集団の性感染症罹患リスクの解析, 第 20 回日本エイズ学会学術集会、東京、2006
 12. 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.
 13. 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.
 14. 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.
 15. 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.
 16. 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.
 17. 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).
 18. 大槻貴博、清水宣明、大上厚志、星野洪郎. 重粒子線照射による HIV-1 感受性変異細胞の誘導: アッセイ系の開発; 第 1 回 COE 研究会 「重粒子線照射を利用したウイルス感染機構の解析」と「内在性ウイルスおよび関連遺伝子に対する重粒子線照射の影響の解析」(群馬). 2005 年 4 月 28 日.
 19. Ohtsuki T, Nakamura T, Oue A, Shimizu N, Wada S, Funayama T, Kobayashi Y, Hoshino H. Establishment of an assay system to isolate HIV-1 susceptibility cell mutants induced by heavy-ion beam irradiation. 第 2 回 COE 国際シンポジウム (群馬). 2005 年 11 月 10 日.

20. 星野洪郎, 田中 淳, 品川雅彦, 清水宣明, Saha M. Narayan, 大槻貴博, 大上厚志, Hoque Sk. Ariful, 清水 晶, 石川 治, 小林泰彦, 和田成一, 舟山知夫. イオン照射の細胞遺伝子・ウイルス遺伝子への影響の解析. 第14回 TIARA 研究発表会(群馬). 2005年6月23-24日.
21. Ohtsuki T, Jinno-Oue A, Shimizu N, Hoshino H. Establishment of a convenient and rapid detection system for determination of HIV/SIV coreceptor usage. 第10回神経ウイルス研究会(石川)2006年6月8-10日.
22. 清水宣明、大上厚志、田中淳、大槻貴博、山口華代、中谷陽子、森隆久、和田成一、小林泰彦、星野洪郎. HIV-1 感染における重粒子線照射の効果とフォルミルペプチド受容体の HIV-1 コレセプター活性に関する研究. 第10回神経ウイルス研究会(石川)2006年6月8-10日.
23. 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10回神経ウイルス研究会(石川)2006年6月8-10日.
24. 大槻貴博、清水宣明、大上厚志、星野洪郎. 重粒子線照射による潜伏感染からの再活性化機構の解明. 第2回 COE 研究報告会(群馬)2006年8月24日.
25. 清水宣明、大上厚志、田中淳、大槻貴博、森隆久、中村孝子、和田成一、小林泰彦、星野洪郎. HIV-1 感染感受性に対する重粒子線の効果の解析. 第54回日本ウイルス学会(名古屋)2006年11月19日~11月21日.
26. 清水宣明、大上厚志、田中淳、大槻貴博、森隆久、中村孝子、内海英貴、野島美久、星野洪郎. 臨床分離株 HIV 株のコレセプター使用性の解析. 第20回日本エイズ学会(東京)2006年11月30日~12月2日.
27. 大上厚志、清水宣明、田中淳、大槻貴博、星野洪郎. ヒト血液脳関門構成細胞への HIV-1 感染性におよぼす血清の影響について. 第20回日本エイズ学会(東京)2006年11月30日~12月2日.
28. Takahiro OHTSUKI, Nobuaki SHIMIZU, Ariful HOQUE, Atsushi TANAKA, Atsushi OUE, Hiroo HOSHINO. NP-2 cell system for determination and detection of HIV/SIV coreceptor usage and infection. The First CMU - Gunma Scientific Meeting on HIV Infection, Chiang Mai University, Chiang Mai, 12 January, 2007.
29. Atsushi OUE, Nobuaki SHIMIZU, Atsushi TANAKA, Takahiro OHTSUKI, and Hiroo HOSHINO. The Blood-brain Barrier and HIV-1. The First CMU - Gunma Scientific Meeting on HIV Infection, Chiang Mai University, Chiang Mai, 12 January, 2007.
30. Nobuaki SHIMIZU, Atsushi OUE, Atsushi TANAKA, Takahisa MORI, Takahiro OHTSUKI, Ariful HOQUE, Chatchawann Apicharpiyakul, Hideki UCHIUMI, Yoshihisa NOJIMA and Hiroo HOSHINO. Identification of Novel Coreceptors and Multiple Uses of Coreceptors by Primary Isolates of Human Immunodeficiency virus type-I. The First CMU - Gunma Scientific Meeting on HIV Infection, Chiang Mai University, Chiang Mai, 12 January, 2007.

31. Muroi M., and Tanamoto K.: Overexpression of IRAK-1 leads to proteasome-dependent downregulation of TRAF6. Joint Meeting of the Society for Leukocyte Biology and the International Endotoxin and Innate Immunity Society (2006, 11)
32. Ohnishi T., Igarashi A., Muroi M., and Tanamoto K.: Novel lipopolysaccharide-recognition mechanism in cells expressing TLR4 and CD14 but lacking MD-2. Joint Meeting of the Society for Leukocyte Biology and the International Endotoxin and Innate Immunity Society (2006, 11)
33. Sugiyama K., Muroi M., and Tanamoto K.: Isolation of peptides that inhibit lipopolisaccharide signaling using Toll-like receptor 4-baited yeast two-hybrid screening. Joint Meeting of the Society for Leukocyte Biology and the International Endotoxin and Innate Immunity Society (2006, 11)
34. Igarashi A., Muroi M., and Tanamoto K.: Effects of possible endocrine disrupting chemicals on Toll-like receptor 2 and 4 signaling. Joint Meeting of the Society for Leukocyte Biology and the International Endotoxin and Innate Immunity Society (2006, 11)
35. Shioiri T., Muroi M., Hatao F., Nishida M., Ogawa T., Mimura Y., Tanamoto K., and Kaminishi M.: Endotoxin-induced endothelial and macrophage cells apoptosis. Joint Meeting of the Society for Leukocyte Biology and the International Endotoxin and Innate Immunity Society (2006, 11)
36. Nishida M., Hatao F., Hiki N., Ogawa T., Mimura Y., Kaminishi M. Muroi M., and Tanamoto K.: New approach for analyzing biological activity of lipopolysaccharide in blood. Joint Meeting of the Society for Leukocyte Biology and the International Endotoxin and Innate Immunity Society (2006, 11)

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得
特許出願
なし
2. 新案登録
なし
3. その他
なし

表1. 平成18年度スクリーニング研究で見いだされた抗HIV活性物質

通しNO.	由来	MT-4		MAGIC5	
		最小有効濃度	最小毒性濃度	IC50	細胞毒性
06003	合成品	1	4	-	5
06007	植物抽出物	-	31.3	19.5	100
06008		-	62.5	10.0	200-100
06010		-	0.5	1.0	20-10
06014		-	15.7	4.8	100-50
06016		-	7.9	4.4	>10.0
06019		-	4	4.5	50
06072		-	7.8	0.9	16
06148		-	0.039	0.001	0.032
06156		-	0.156	0.05	0.8
06157		-	0.156	0.08	0.8
06158		-	0.156	0.03	0.8
06159		-	0.313	0.07	0.8
06166		-	1.25	0.1	4
06175		植物	-	500	36.0
06181	-		250	12.5	250
06188	-		125	12.5	250-125
06227	伝統薬物抽出物	-	125	13.8	160
06247		-	1000	73.1	800
06250		500	2000	-	-
06253		-	1000	53.7	2000
06255		-	500	53.8	800
06259		-	1000	57.5	2000
06262		500	1000	47.8	2000
06263		-	500	51.1	800
06265		-	125	5.8	400
06267		-	250	24.7	400
06268		500	1000	58.8	1000
06298	未公開	31.3	500	12.8	500-250
06299		15.6	500	13.5	500-250
06300		-	>50	1.6	50-25
06305		0.78	12.5 μ l/ml	-	2

単位: μ g/ml

表 2. 平成 17 年度陽性サンプルの抗 HIV 作用機作

検体番号	巨細胞形成 抑制 (%)	CCR5 への 作用 (2D7)	逆転写酵素阻 害 (IC ₅₀)	細胞変性抑制試験	
				MAGIC-5 (IC ₅₀) μg/ml	MT-4 (IC ₁₀₀) μg/ml
5023	0	43.7	-	5.5	-
5028	0	55.8	-	-	-
5095	0	17.7	-	4.4	-
5103	0	26.2	13.5	7.9	-
5104	0	40.8	-	14.5	10.0
5109	0	-10.9	16.9	1.7	62.5
5207	0	19.6	-	5.0	-
5505	0	63.7	8.5	15.5	0.8
陽性対照	100	70.9			

厚生労働科学研究費補助金（政策創薬総合研究事業）
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、Trinh Duy Quang

研究要旨 ベトナムで母子感染により HIV に感染した児 29 例のサブタイプを決定した。その結果ベトナムにおいて母子感染を起こした HIV はすべて CRF01_AE であった。サブタイプ特異的プライマーを用いての測定はシーケンスによる決定に比べ、感度は約 93% であった。6 サンプルにプロテアーゼ阻害薬耐性である minor mutation が見られた。

A. 研究目的

いまだ HIV 感染症は世界中で急増傾向にあり、アジア諸国では爆発的に流行している。母子感染と性行為感染がその主な感染経路と考えられているがベトナムにおいては薬物注射使用も多い。ベトナムで流行している HIV サブタイプは CRF01_AE が優位であり、数%が薬剤耐性を持っているとされている。しかしながら母子感染例についてはほとんど調査されていない。そこで、母子感染児についてサブタイプ特異的プライマーを用いた PCR によりサブタイピングを行い。シーケンスによる結果と比較した。またシーケンスにより薬剤耐性について解析を行った。

B. 研究方法

ベトナム・ホーチミン市内の小児病院において抗ウイルス薬を投与されていない HIV 陽性の母親から生まれた児で、HIV 抗体陽性の血液 29 サンプルを供与された。月齢は 1 カ月から 50 カ月までであった(表 1)。このサンプルから DNA を抽出した。v3 領

域及び pol 領域を PCR で増幅し、シーケンスを行った。

v3 領域のシーケンスよりサブタイプ、pol 領域のシーケンスよりサブタイプおよび薬剤耐性を決定した。gp41 領域に設定したサブタイプ特異的プライマーを用いた PCR (J Med Virol. 2005;76:16-23)によりサブタイプを決定した。

C. 研究結果

28 サンプルが v3 領域のシーケンスより CRF01_AE であると決定された(表 2)。また、26 サンプルはサブタイプ特異的プライマーを用いた PCR でも同じ結果を得た。1 サンプルは v3、pol、およびサブタイプ特異的プライマーすべての PCR の結果においてネガティブであった(表 2)。v3 および pol 領域の配列による phylogenetic tree を図 1 に示す。薬剤耐性については逆転写酵素阻害薬耐性、プロテアーゼ阻害薬耐性の major mutation は共に見つからなかった。6 サンプルでプロテアーゼ阻害薬耐性の minor mutation が見いだされた(表 3)。

D. 考察

すべての PCR でバンドが見られたかった1サンプル(VC08)は HIV 陰性であると思われ、母親の移行抗体によって ELISA 陽性となった可能性がある。ベトナムでの母子感染による HIV 感染児での主たるサブタイプは CRF01_AE であった。我々の設計したサブタイプ特異的プライマーによるサブタイプ特定の感度は 93%(26/28)で、シーケンスによらずサブタイプ特定ができ、有用であることが立証された。

E. 結論

本研究で見いだしたベトナムで母子感染を起こした HIV はすべて CRF01_AE であった。サブタイプ特異的プライマーの感度は約 93%であった。6 サンプルにプロテアーゼ阻害薬耐性である minor mutation が見られた。

F. 知的所有権の出願・取得状況
なし

G. 研究発表

1. 学会発表

- 1 柳生文宏、沖津祥子、牛島廣治 絨毛癌細胞および直腸癌細胞における G プロテインレセプターの発現 日本ウイルス学会 第54回学術集会 2006.11.29-21.

2. 論文発表

1. Phan TG, Kuroiwa T, Kaneshi K, Ueda Y, Nakaya S, Nishimura S, Yamamoto A, Sugita K, Nishimura T, Yagyu F, Okitsu S, Müller WEG, Maneekarn N, Ushijima H. Changing Distribution of Norovirus Genotypes and Genetic

Characterization of Recombinant GIIB among Infants and Children with Diarrhea in Japan. *J Med Virol*. 78(7): 971-978, 2006.

2. Phan TG, Yagyu F, Kozlov V, Kozlov A, Okitsu S, Müller WEG, Ushijima H. Viral gastroenteritis and Genetic Characterization of Recombinant Norovirus among Infants and Children with Diarrhea in Eastern Russia. *Clin Lab* 52 (5-6): 247-253, 2006.
3. Phan TG, Yan H, Li Y, Okitsu S, Müller WEG, Ushijima H. Novel Recombinant Norovirus in China. *Emerg Infect Dis*. 12(5): 857-858, 2006.
4. Phan TG, Okitsu S, Müller WEG, Kohno H, Ushijima H. Identification of Novel Recombinant Sapovirus in Japan. *Emerg Infect Dis*. 12(5): 865-867, 2006.
5. Khamrin P, Maneekarn N, Peerakome S, Yagyu F, Okitsu S, Ushijima H. Molecular characterization of a rare G3P[3] human rotavirus reassortant strain reveals an evidence for human-animals multiple interspecies transmissions. *J Med Virol* 78(7):986-994, 2006.
6. Phan TG, Trinh OD, Yagyu F, Sugita K, Okitsu S, Muller WEG, Ushijima H. Outbreak of sapovirus infection among infants and children with acute gastroenteritis in Osaka City, Japan during during 2004-2005. *J Med Virol* 78(6):839-846, 2006.

7. Okame M, Akihara S, Hansman G, hainan Y, Thien Tuan Tran H, Phan TG, Yagyu F, Okitsu S, Ushijima H. Existence of multiple genotypes associated with acute gastroenteritis during 6-year survey of norovirus infection in Japan. *J Med Virol* 78(10):1318-1324, 2006.
8. Phan TG, Shimizu H, Okitsu S, Maneekarn N, Ushijima H. Human adenovirus type 1 related to feline adenovirus: evidence of interspecies transmission. *Clin Lab* 52 (9-10): 515-518, 2006.
9. Phan TG, Takanashi S, Kaneshi K, Ueda Y, Nakaya S, Nishimura S, Sugita K, Nishimura T, Yamamoto A, Yagyu F, Okitsu S, Ushijima H. Detection and genetic characterization of norovirus strains circulating among infants and children with acute gastroenteritis in Japan during 2004-2005. *Clin Lab* 52 (9-10): 519-525, 2006.
10. Phan TG, Yan H, Khamrin P, Quang T, Dey SK, Yagyu F, Okitsu S, Mueller WEG, Ushijima H. Novel intragenotype recombination in sapovirus. *Clin Lab* 52(7-8):363-366, 2006.
11. Okitsu-Negishi S, Okame M, Shimizu Y, Phan TG, Tomaru T, Kamijo S, Sato T, Yagyu F, Mueller WEG, Ushijima H. Detection of norovirus antigens from recombinant virus-like particles and stool samples by a commercial norovirus enzyme-linked immunosorbent assay. *J Clin Microbiol* 44(10):3784-3786, 2006.
12. Phan TG, Khamrin P, Quang TD, Dey SK, Yagyu F, Okitsu S, Nishio O, Ushijima H. Genetic characterization of group A rotavirus strains circulating among children with acute gastroenteritis in Japan in 2004-2005. *Infection, Genetics and Evolution* 7: 347-253, 2007.
13. Phan TG, Trinh QD, Kaneshi K, Ueda Y, Nakaya S, Nishimura S, Sugita K, Nishimura T, Yamamoto A, Yagyu F, Okitsu S, Ushijima H. Emergence of new variant rotavirus G3 among infants and children with acute gastroenteritis in Japan during 2003-2004. *Clin Lab*, 53: 41-48, 2007.
14. Maneekarn N, Khamrin P, Chan-it W, Peerakome S, Sukchai S, Pringprao K, Ushijima H. Detection of rare G3P[19] porcine rotavirus strains in Chiang Mai, Thailand provides evidence for the origin of VP4 genes of Mc323 and Mc345 human rotaviruses. *J Clin Microbiol* 44:4113-4119, 2006.
15. Terao Y, Takagi H, Phan TG, Okitsu S, Ushijima H. Identification of IgA against coronavirus in breast milk. *Clin Lab*, in press.
16. Shimizu H, Phan TG, Nishimura S, Okitsu S, Maneekarn N, Ushijima H. An outbreak of adenovirus serotype 41 infection in infants and children with acute gastroenteritis in Maizuru city,

- Japan. *Infect, Genet and Evol* .
7:279-284, 2007
17. Phan TG, Trinh QD, Yagyu F, Okitsu S, Ushijima H. Emergence of rare sapovirus genotype among infants and children with acute gastroenteritis in Japan. *European J Clin Microbiol & Infect Diseases* 26(1): 21-27,2007.
 18. Zhou Y, Ushijima H, Frey TK. Genomic analyses of diverse rubell virus genotypes. *J Gen Virol* 88:932-941, 2007.
 19. Khamrin P, Maneekarn N, Peerakome S, Chan-It W, Yagyu F, Okitsu S, Ushijima H. Norvel porcine rotavirus of the genotype P[27] shares new phylogenetic lineage with G2 porcine rotavirus strain. *Virology* 2007 (E-pub).
 20. Makita K, Hayakawa Y, Okame M, Homma K, Phan TG, Okitsu S, Ushijima H. First detection of IgA against Norovirus in breast milk. (short communication) *Clin. Lab.*, in press.
 21. Dieng H, Boots M, Tamori N, Satho T, Higashihara J, Okada T, Kato K, Komalamisra N, Ushijima H, Takasaki T, Kurane I, Eshita Y. Effect of food, embryo density and conspecific immatures on hatchability in the dengue vector *Aedes albopictus* House and household insect pest, in press.
 22. Dieng H, Boots M, Higashihara J, Satho T, Kato K, Okada T, Komalammisra N, Ushijima H, Takahashi T, Kurane I, Eshita Y. Two dimensional gel analysis of midgut proteins of the dengue vector *Aedes albopictus* (Diptera Culicidae) with reference to sex and Bbody size. *Jpn J Environ Entemol Zool*, in press.
 23. Nguyen TA, Yagyu F, Okame M, Phan TG, Yan H, Hoang PL, Cao Anh TH, Hoang KT, Okitsu S, Ushijima H. Diversity of viruses associated with acute gastroenteritis in children hospitalized with diarrhea in Ho Chi Minh city, Vietnam. *J Med Virol*, in press.
 24. Trinh QT, Nguyen TA, Phan TG, Khamrin P, Yan H, Hoang PL, Maneekarn N, Yagyu F, Okitsu S, Ushijima H. Amino acid substitution in VP7 sequences of human rotavirus G1 isolated in Japan, China, Thailand, and Vietnam in 2002-2003. *J Med Virol*, in press.
 25. Wang XT, Liu PY, Tang JB, Mizutani H, Xin KQ, Ozawa K, Ushijima H. Tendon healing in vitro: Adeno-associated virus-2 effectively transduces intrasynovial tenocytes with persistent expression, but other serotypes do not. *Hand/Peripheral Nerve Plastic and reconstructive surgery*. 119(1):227-234, 2007
 26. Ushijima H. Foreword. Mother and child health in Asia and Africa. *Pediatrics International*, in press.