

た(表2)。

本研究では、AHをHIV/AIDS感染予防薬として開発するため、(1) AHの大量生産系確立、(2) AH及びHis-TEV-AH dimer/RTB-Lの安全性試験及び(3) 血中投与可能なHIV/AIDS治療薬の開発を目的として、ポリエチレングリコール化による免疫原性低下を試みた。

## ■B. 研究方法

### <AHの大量生産系確立に関する検討>

His-TEV-AH dimer/RTB-LをPCRで増幅し、酵母発現ベクターpPICZ-Bに連結した。このプラスミドで*Pichia pastoris* KM71H株を形質転換し、His-TEV-AH dimer/RTB-L発現酵母株を作成した。

### <安全性試験>

#### (1) マイトジェン活性化試験:

ヒトPBMCを無血清RPMI培地で懸濁し、各試料存在下、96穴プレートに $5 \times 10^5$  cells/100  $\mu$ lずつ蒔いた。42時間培養し、<sup>3</sup>H-チミジンを加えさらに6時間培養し、シンチレーションカウンターにより細胞のラジオアクティビティーを測定した。また、顕微鏡にて細胞塊を観察した。

#### (2) ウサギの膣に対する安全性試験:

実験には約1.8kgの雌性日本白色ウサギ(日本SLC)を使用した。1週間の予備飼育後実験に供した。アクチノヒピンは0.5% carboxymethylcellulose (CMC) 溶液に懸濁後、ソニケーション処理により均一化した。投与は、イソフラン吸入麻酔下にウサギを固定し、ソフトゾンデで膣口から約10cmの深さに挿入して行った。各濃度のアクチノヒピン溶液1.0mlを10日間連続投与した。飼料および飲水は自由摂取とした。

投与終了後、ウサギは吸入麻酔下に頸部皮膚を切開し頸動脈を露出し、放血致死した。腹部を正中線に沿って切開し、膣、子宮を摘出した。摘出した組織は10%中性緩衝ホルマリン液に浸して固定した。

表2 His-TEV-AH dimer/RTB-Lの臨床分離HIV株に対する抗HIV活性

HIV strain	IC <sub>50</sub> (nM)		fold	number of N-glycosylation
	AH	His-TEV-AH dimer/RTB-L		
37	>10000	>1000	-	14
307	620	35	18	15
36	>10000	4	>2500	16
Bal	34	4	8	17
214	44	6	8	17
251	23	7	3	17
NL	34	2	16	18
182	30	9	3	18
242	140	76	2	19
158	10	2	5	20

定法に従いパラフィン包埋後、ヘマトキシリン・エオジン(HE)染色し組織標本を作製した。尚、動物実験はいわき明星大学実験動物倫理規定に従って行われた。

### <AHのポリエチレングリコール化>

PEG化反応液(100 mM酢酸ナトリウム(pH 5.0)、20mM水素化ホウ酸ナトリウム、12.3 mM His-TEV-AH、12.3 mM 20 kDa/30 kDa m-PEG aldehyde、30%アセトニトリル)を25℃で6時間インキュベートした。反応液をODSカラムで脱塩・精製し、ゲル濾過でPEG化AHを単離した。HIVの接着・侵入の過程をモデル化した合胞体形成系を用いてAH及びPEG化AHの阻害活性を比較し、PEG化による活性への影響を検討した。

## ■C, D. 研究結果と考察

### <AHの大量生産系確立に関する検討>

既存のAH生産系として、放線菌及び大腸菌の系が存在する。放線菌ではnativeのAHのみ生産可能であるが、大腸菌においてはHis-TEV-AH dimer/RTB-Lをはじめとする種々の変異体の調製が簡便かつ迅速にできる。しかし、大腸菌を宿主として調製した試料には、LPSが混入している恐れがあるため、医薬品としての活用に適さない。そこで、LPS混入の恐れがない酵母によるAH生産系を確立することにした。His-TEV-AH dimer/RTB-L遺伝子をPCRで増幅し、酵母発現ベクターpPICZ-Bに連結した。このプラスミドでKM71H株を形質転換し、His-TEV-AH dimer/RTB-Lが酵母菌体内に発現したことを確認した。しかし、生産量は1 L cultureあたり25mg程度であるため、現在、高生産株の構築を検討している。今後、種々のAH変異体を大腸菌の系で調製し、活性の評価を迅速に行い、改良された変異体を酵母生産系にて調製し、前臨床試験に供する。

### <安全性試験>

コンカナバリンA(Con A)やフィトヘマグルチニン(PHA)をはじめとする糖鎖結合性タンパク質は、マイトジェン活性を示すことが知られている。また、HIV/AIDS感染予防薬として開発が進められているシアノビルン-N(CV-N)は、AH同様HIV gp120の高マンノース型糖鎖に結合し、強い抗HIV活性を示すが、マイトジェン活性を有することが報告されており、医薬品としての開発が困難であると考えられる。そこで、AHにおいてもマイトジェン活性が見られるかどうかを検討した。その結果、

ConA、PHA及びCV-Nでは1.0 μMにおいて顕著な細胞凝集塊が観察された(図4)。また、シンチレーションカウンターにて、<sup>3</sup>H-チミジンの取り込み量の増大も計測された。一方、AH及びHis-TEV-AH dimer/RTB-Lでは、1.0 μMでも凝集塊と<sup>3</sup>H-チミジン取り込み量の増大は観察されず(図5)、AHはマイトジェン活性を示さないと考えられた。また、ウサギ陰に対する安全性試験に関して、摘出した陰並びに子宮について外部観察を行った(図6)。無処置正常群でわずかに肥厚が観察されたが、他のいずれの群でも炎症反応を示す腫脹、発赤、充血・肥厚、紅斑は観察されなかった。組織標本観察は投与部位に近い陰外陰部側について行った(図7)。多くの例に共通した所見として、陰腔内に好塩基性の顆粒状結晶物質が観察され、一部は粘膜表面に付着するように認められた。陰実質では、炎症性細胞浸潤と粘膜上皮の重層化が主な所見であった。炎症性細胞浸潤は粘膜固有層～粘膜下組織(組織学的には両者の境界は不明瞭)において瀰漫性に観察され、リンパ球ないし形質細胞が主体の偽好酸球も見られた。さらに、多数の例において粘膜上皮内(上皮細胞間)にも炎症性細胞浸潤が認められた。これら一連の炎症

性細胞浸潤は、アクチノヒビン0.3、1.0mg投与群、無処置正常群で軽度～中等度に認められたが、アクチノヒビン0.1mg投与群ではごく僅かしか観察されなかった。子宮側と外陰部側の2か所の標本を比べると、外陰部側の病変がやや目立つ傾向にあったため、組織観察は外陰部側について行った。無処置正常群、vehicleである0.5%CMC単独投与群、アクチノヒビン0.1、0.3、1.0mg/ml投与群のいずれにおいても軽度～中等度の炎症性細胞浸潤、粘膜上皮重層化、水腫性変化が認められた。また、外部観察では著明な炎症は観察されなかった。以上の結果より、アクチノヒビンを投与していない無処置正常群、0.5%CMC単独投与群でもこのような結果が得られたことから、これらの炎症様反応はウサギ陰では常在的なものであり、アクチノヒビン投与による影響ではないことが示唆される。

<AHのポリエチレングリコール化>

AHをHIV/AIDS治療薬として血中投与する場合、血中半減期や免疫原性が問題となる。しかし、PEGインターフェロンでは、タンパク質をポリエチレングリコールで修飾することで、血中半減期を延長し、免疫原性を低下させることに成功している。そこでAHをPEG化することで、血中投与できるHIV/AIDS治療薬の開発を検討することにした。PEGは、N末端アミノ酸のアミノ基に特異的に結合するm-PEG aldehyde (20kDa又は30kDa)を用いた。PEG化されたAH (PEG-His-TEV-AH)をODSカラムで精製し、ゲル濾過で単離した。合胞体形成阻害活性を測定したところ、His-TEV-AHの1/2となった(表3)。若干の活性低下は見られたが、今後、PEG化AHをマウスに血中投与し、抗体産生抑制効果を調べる。

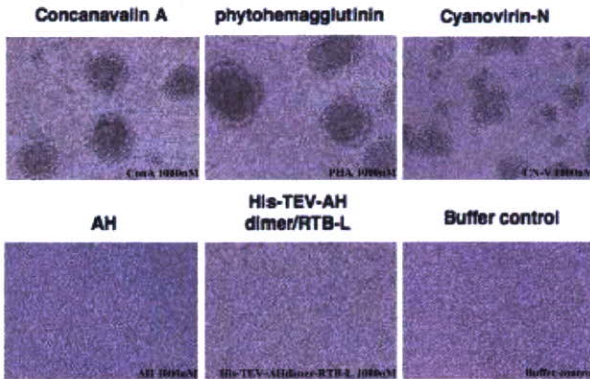


図4 AH及び種々レクチンによる細胞凝集塊の顕微鏡観察

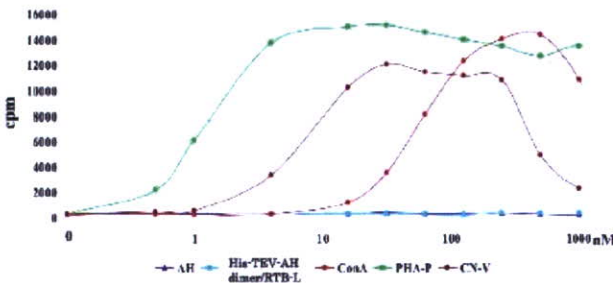


図5 AH及び種々レクチンによる<sup>3</sup>H-チミジン取り込み量の計測

Protein	IC <sub>50</sub> (μM)
His-TEV-AH	0.19
20k-PEG-His-TEV-AH	0.40
30k-PEG-His-TEV-AH	0.46

表3 His-TEV-AH及びPEG化AHの合胞体形成阻害活性

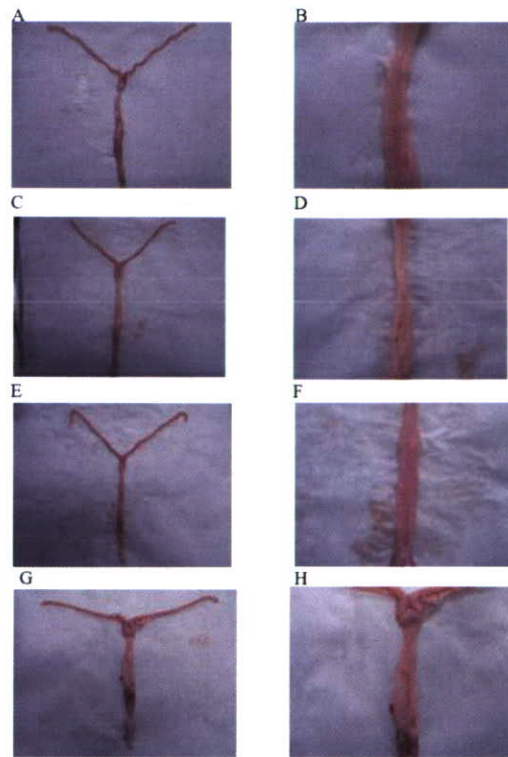


図6 ウサギ子宮及び膣に対するAHの影響

- |                         |                       |
|-------------------------|-----------------------|
| A: 0.5% CMC 子宮及び膣全体     | B: 0.5% CMC 膣部分拡大     |
| C: 0.1 mg/ml AH 子宮及び膣全体 | D: 0.1 mg/ml AH 膣部分拡大 |
| E: 0.3 mg/ml AH 子宮及び膣全体 | F: 0.3 mg/ml AH 膣部分拡大 |
| G: 1.0 mg/ml AH 子宮及び膣全体 | H: 1.0 mg/ml AH 膣部分拡大 |

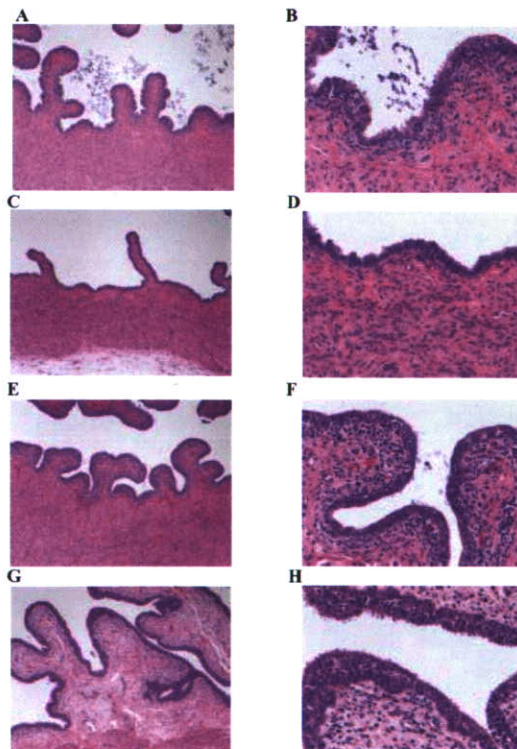


図7 膣外陰部側の組織標本

- |                              |                              |
|------------------------------|------------------------------|
| A: 0.5% CMC 粘膜面の標本 (10倍)     | B: 0.5% CMC 粘膜面の標本 (40倍)     |
| C: 0.1 mg/ml AH 粘膜面の標本 (10倍) | D: 0.1 mg/ml AH 粘膜面の標本 (40倍) |
| E: 0.3 mg/ml AH 粘膜面の標本 (10倍) | F: 0.3 mg/ml AH 粘膜面の標本 (40倍) |
| G: 1.0 mg/ml AH 粘膜面の標本 (10倍) | H: 1.0 mg/ml AH 粘膜面の標本 (40倍) |

## ■ E. 結論

これまで高活性AH変異体、His-TEV-AH dimer/RTB-Lは大腸菌を宿主として調製してきたが、試料にLPSが混入する恐れがあり、医薬品としての活用には適さない。そこで、医薬品としての開発を目指したHis-TEV-AH dimer/RTB-Lの調製は、LPS混入の恐れのない酵母生産系にて行うこととした。現時点で生産量は、1 L cultureあたり25 mg程度であり、多くはない。今後、His-TEV-AH dimer/RTB-L高生産株の構築を検討すると共に、酵母以外でも種々の宿主を検討し、安価で大量かつ安全な試料を調製できる系を模索する。AHは、CV-Nのようなマイトジェン活性を持たないことが明らかにされ、ウサギ腫に対して1.0 mg/mlでも炎症効果等を示さないことから安全性の高い優れたHIV/AIDS感染予防薬として期待される。今後はHis-TEV-AH dimer/RTB-Lについても、より高濃度における安全性を検証し、カニクイザルを用いたSIV（又はSHIV）感染阻害実験を検討する。また、PEG化AHに関しては、マウスへ血中投与し、抗体産生抑制効果を調べると共に、高活性AH変異体のPEG化も検討し、血中投与可能なHIV/AIDS治療薬としての開発を目指す。

## ■ F. 健康危険情報

該当無し

## ■ G. 研究発表

### 1. 論文発表

無し

### 2. 学会発表

無し

## ■ H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

### 1. 特許取得

#### (1) 特願2006-323043

発明の名称：アクチノヒピン多量体を含む融合タンパク質からなる抗HIV薬、これを構成するポリペプチド、ポリペプチドをコードする遺伝子および抗HIVの製造法

発明者：田中 晴雄、猪腰 淳嗣、高橋 淳、大村 智、(有)キイム・ファーマ・ラボ

#### (2) PCT/JP2005/021981

発明の名称：抗HIV薬、これを構成するポリペプチド、ポリペプチドをコードする遺伝子、抗HIV薬の製造方法

発明者：田中 晴雄、猪腰 淳嗣、大村 智、(有)キイム・ファーマ・ラボ

#### (3) PCT/JP99/051199（アメリカ及びオーストラリアで特許取得済み）

発明の名称：抗ヒト免疫不全ウイルス活性を有するポリペプチド、ポリペプチドをコード化する遺伝子、ポリペプチドの製造方法

発明者：田中 晴雄、大村 智、(有)キイム・ファーマ・ラボ

## 分担研究課題

## 新規な機序による抗HIV薬剤の合成展開とその実用化



分担研究者  
野村 伸彦

富山化学工業株式会社 総合研究所 第3研究部 主幹研究員

前年度のヒット化合物から合成展開した142化合物について、①抗HIV活性 ( $IC_{50} < 10$  ng/mL)、②マウスにおける経口吸収性、③マウス単回経口毒性試験 (致死量  $>2000$  mg/kg) を指標に、3化合物を選択した。これらの化合物の遺伝毒性試験 (微生物を用いた変異原性試験、マウス小核誘発性試験) を行ったところ、いずれも陰性であった。次に、ヒト肝ミクロソームを用いて代謝の影響を検討したところ、いずれも90%以上が残存していた。上記の化合物から1化合物を選択し、マウスに1日1回100 mg/kgを2週間反復経口投与したところ毒性所見は認められなかった。

## ■ A. 研究目的

HIV/AIDS症は、HAART療法の確立と近年の新薬の開発により治療可能な慢性疾患と位置付けられつつある。しかし、薬剤の組み合わせやアドヒランスが悪い場合は容易に耐性ウイルスが出現することに加え、特定の薬剤に耐性となったウイルスは、同系統の薬剤に対しても交差耐性を示すことが多いため、新規な作用機序を有する新薬の開発が望まれている。

我々は、これまでに新規な作用機序と強い抗HIV活性を有し、マウスにおいて経口吸収性を示す化合物を見出している。現在、臨床可能な薬剤の開発を目標として様々な検討を行っている。

## ■ B. 研究方法

### i) 新規化合物の合成

前年度に見出されたヒット化合物からの誘導体を有機化学的手法を用いて合成した。

### ii) 新規合成化合物の評価

#### ① *In vitro* 抗HIV活性の評価

国立感染症研究所にて実施した。

#### ② 経口吸収性の検討

0.5%メチルセルロースに懸濁させた被験物質をマウス (ICR, 6W, ♂) に25mg/kg単回経口投与し、1、4及び12時間後に採血した。調製した血清と等量の

アセトニトリルとの混合により除蛋白し、その遠心上清中の薬物濃度をHPLC (島津製作所、Prominenceシリーズ、カラム: XTerra RP18 3.5 $\mu$ m 4.6 $\times$ 100mm) にて測定した。

#### ③ マウス単回投与毒性試験

0.5%メチルセルロースに懸濁した被験物質をマウス (ICR, 6W, ♂) に経口投与後、翌日まで観察すると共に、生存する最大投与量を求めた。

#### ④ マウス反復投与毒性試験

0.5%メチルセルロースに懸濁した化合物Aを、マウス (ICR, 6W, ♂) に1日1回、100 mg/kgを2週間反復経口投与した。投薬終了翌日 (剖検日) にジエチルエーテル麻酔下で下大静脈から血液を採取し、血液学的及び血液生化学的検査を行った。

#### ・血液学的検査

EDTA-2Kで抗凝固処理した血液について総合血液学検査装置 (ADVIA 120、バイエルメディカル株式会社) を用いて以下の項目を測定した。測定試薬は全てバイエルメディカル株式会社製を用いた。

検査項目: 赤血球数 (RBC)、白血球数 (WBC)、ヘマトクリット (HCT)、ヘモグロビン濃度 (HGB)、平均赤血球容積 (MCV)、平均赤血球ヘモグロビン量 (MCH)、平均赤血球ヘモグロビン濃度 (MCHC)、

血小板数 (PLT)、白血球百分率、網赤血球数

#### ・血液生化学的検査

ヘパリン処理した血液を遠心分離して得た血漿について、自動分析装置 (日立7070形、株式会社日立製作所) を用いて以下の項目を測定した。測定試薬はすべて和光純薬工業株式会社製を用いた。

検査項目: AST、ALT、アルカリ性フォスファターゼ (ALP)、クレアチンキナーゼ (CK)、乳酸脱水素酵素 (LDH)、トリグリセリド、リン脂質、総コレステロール、総蛋白、アルブミン、アルブミン/グロブリン比 (A/G比)、尿素窒素 (BUN)、クレアチニン、血糖、総ビリルビン、無機リン (IP)、カルシウム (Ca)、ナトリウム (Na)、カリウム (K)、塩素 (Cl)

#### ・統計処理

体重、血液学的検査値及び血液生化学的検査値について媒体対照群と各投与群の平均値及び標準偏差を算出し、等分散性の検定 (F検定) を行った。等分散の場合は Student の t 検定、不等分散の場合は Aspin-Welch の検定を用いて比較し、両側検定で  $p < 0.05$  を有意差ありとした。統計ソフトには、SAS release 8.2 (株式会社 SAS インスティテュートジャパン) を用いた。

#### ⑤微生物を用いた変異原性試験 (Ames 試験)

試験菌株として、*Salmonella Typhimurium* TA98 を用いた。所定の用量となるように調製した各被験物質溶液 0.1 mL を滅菌した小試験管に取り、直接法では 0.1 mol/L リン酸緩衝液 (pH 7.4)、代謝活性化法では S9mix の 0.5 mL を加え、さらに前培養した菌液 0.1 mL を加えて 37°C で 20 分間振盪培養 (プレインキュベーション) した。次いで、45°C に保温した上層軟寒天培地 (塩化ナトリウム 5 g/L, Bacto-agar (Difco) 6 g/L, 0.05 mM L-ヒスチジン-0.05 mM D-ビオチン) 2 mL を加えて混和した後、テストメディア AN 培地 (オリエンタル酵母工業) 上に重層した。これを 37°C で 42 時間培養後、実体顕微鏡を用いて試験菌株に対する生育阻害及び肉眼で被験物質の沈殿の有無を調べ、復帰変異コロニー数をコロニーカウンターで測定した。

試験結果の判定に関しては、被験物質の用量にかかわらず復帰変異コロニー数が陰性対照値の 2 倍未満であった場合に陰性と判定した。

#### ⑥マウス小核誘発性試験

用量設定試験として、0.5% メチルセルロースに懸濁した被験物質を、マウス (ICR, 8W, ♂) に 1 日 1 回 2 日間経口投与し、生存可能な最大投与量を求めた。次に、この投与量を、1 群 3 匹のマウスに 1 日 1 回 2 日間経口投与し、最終投与 24 時間後に、頸椎脱臼にて安楽死させたマウスより大腿骨を摘出した。摘出した大腿骨より骨髓細胞を牛胎児血清で遠沈管に洗い出し、遠心 (190 × g, 5 min.) 後、骨髓細胞をスライドガラスに塗抹しメタノール固定後、アクリジン・オレンジ染色を行った。

小核の観察は 1 個体あたり 1000 個の多染性赤血球について行い、小核を有する多染性赤血球 (micronucleated polychromatic erythrocytes; MNPCE) の出現率を求めた。被験物質を投与した各マウスの小核を有する多染性赤血球の出現頻度がいずれも 0.5% 以下の場合を陰性とした。

#### ⑦ *In vitro* 代謝試験

株式会社 ケー・エー・シー から購入したヒト肝ミクロソームを入荷後約 -80°C の冷凍庫内に保管し、使用時に 37°C の水浴中で速やかに溶解した後に 100 mmol/L トリス塩酸緩衝液 (pH 7.5) で希釈した。反応液の組成は、酵素: 終濃度 1 mg protein/mL、NADPH 生成系 Solution A (BD gentest): 1/20 vol, NADPH 生成系 Solution B (BD gentest): 1/100 vol, 100 mmol/L トリス塩酸緩衝液 (pH 7.5) であり、5 分間プレインキュベート後に被験物質を終濃度で 40 μM 加え、37°C の水浴中で 0 時間及び 2 時間インキュベートし、氷冷したアセトニトリルを等量添加して反応を停止させた。その後遠心分離 (13,200 × g, 4°C, 10 min) した上清について、各被験物質の濃度を HPLC にて測定し、インキュベート 0 時間の被験物質ピークのエリアに対する 2 時間のエリア比を残留率 (%) として算出した。

#### iii) 倫理面への配慮

本試験は、富山化学工業株式会社が定めた「実験動物使用管理規定」に従って実施した。

## ■ C. 研究結果

前年度見出されたヒット化合物から合成展開した 142 化合物について、 $IC_{50} < 10$  ng/mL の抗 HIV 活性が認められた 63 化合物につき、マウスを用いて経口吸収性の検討を行った (表 1)。良好な経口吸収性を示した化合物につき、マウス単回投与毒性試験を行い、2000 mg/kg 経口投与で生存が見られた 3 化合物を選択した。

これらの化合物につき、微生物を用いた変異原性試験及びマウス小核誘発性試験を行ったところ、いずれも陰性であった。更にヒト肝ミクロソームを用いて代謝の影響を検討したところ、いずれも90%以上の残存率が確認された(表2)。上記の化合物から1化合物を選択し(化合物A)、マウスに1日1回100 mg/kgを2週間反復経口投与したところ、毒性所見は認められなかった。

#### ■ D. 結論

既存薬の耐性変異ウイルス株に感受性を示す新規な作用機序を有する化合物の合成展開並びに評価を継続して行ってきた結果、強い抗HIV活性に加え、体内動態及び安全性面が改善した化合物を見出した。今後は、投与期間の延長並びに別種の動物を用いた反復投与毒性試験等を行いながら、候補化合物の評価並びに絞込みを行っていく予定である。

#### ■ E. 健康危険情報

特記事項なし

#### ■ F. 研究発表

特に無し

#### ■ G. 知的財産権の出願・登録予定

特許出願準備中

表1 スクリーニングサンプルの *in vitro* 抗HIV活性内訳 (サンプル数)

IC <sub>50</sub> (μM)	H16年度	H17年度	H18年度	H19年度
~<0.0001	0	0	0	4
0.0001~<0.001	6	8	20	16
0.001~<0.01	23	11	32	43
0.01~<0.1	19	36	36	36
0.1~<1	12	32	37	20
1~<5	9	21	14	5
>5	44	143	53	18
総サンプル数	113	251	192	142

表2 抗HIV活性を示す化合物の特性

	化合物A	化合物B	化合物C
抗HIV活性 (IC <sub>50</sub> : ng/mL)	3.3	0.66	1.0
マウス血中濃度 (p.o.)* (1/4/12 hr : ng/mL)	1900 / 1900 / 1200	3100 / 1900 / 700	5300 / 2800 / 500
マウス単回経口投与毒性 最大非致死量 (mg/kg)	>2000	>2000	>2000
遺伝毒性 マウス Ames試験** / <i>in vivo</i> 小核試験	陰性 / 陰性	陰性 / 陰性	陰性 / 陰性
ヒトミクロソーム 安定性 (原体残存率%)	99.3	100.1	93.6

\* 25 mg/kg, \*\* *Salmonella* Typhimurium TA98





## 分担研究課題

## HIV-1 各種変異体を用いた薬剤標的ウイルス蛋白質の解析



分担研究者

足立 昭夫

徳島大学大学院 ヘルスバイオサイエンス研究部 教授

新しい薬剤標的となり得るHIV-1アクセサリー蛋白質とその評価システムの確立に向け、本年度は、(1) HIV-1のアクセサリー蛋白質Vifと抗ウイルス細胞因子APOBEC3G/Fとの結合部位の同定および(2) サル発症モデルの確立を目指した新しいサル指向性HIV-1の構築を行なった。得られた成績は以下の通りである。(1) 詳細かつ広範な点変異体解析の結果から、HIV-1 VifのN末端側にAPOBEC3G/Fとの結合およびそれらのウイルス粒子からの排除に重要な領域があることが明らかになった。アミノ酸残基21-43は、APOBEC3G 存在下の変異体のMAGI感染価、変異体ウイルス粒子内のAPOBEC3G量および変異体とAPOBEC3Gとの結合能から、APOBEC3G結合領域であると結論された。アミノ酸残基69-79のうち、69番目のアミノ酸は既に我々が報告しているVifの安定性に関わる領域内であったが、76および79番目のアミノ酸はAPOBEC3F存在下におけるMAGI感染価から、VifとAPOBEC3Fとの相互作用に重要であることがわかった。76および79番目のアミノ酸は実際にAPOBEC3Fとの結合に関与していた。(2) サル細胞での複製・増殖に最適化したウイルスクローンの分子構築を目指し、プロトタイプサル指向性HIV-1クローンNL-DT5R (X4ウイルス) とそのR5ウイルスバージョンNL-DT5R5-1を用いて細胞馴化を試みた。その結果、サル細胞に適応して増殖効率が向上しCPE惹起能が増強された分子クローンが複数得られたので、それぞれMN4およびMN5クローンと命名した。増殖効率が最も著しく向上したクローンのゲノムシーケンスを決定したところ、親株からの変異はLTRと*gag* (MA)、*pol*、*vif*、*vpr*、*env*および*nef*遺伝子に少数認められたのみであった。MN4/MN5クローンに共通して見られる変異の存在する領域はLTR、*pol* (IN)、*vif* (アミノ酸置換を伴わない変異) および*env* (SU) であった。

## ■ A. 研究目的

HIV-1 Vifは自然宿主細胞（リンパ球およびマクロファージ）でのウイルス複製に必須であり、したがって、エイズ発症にも必須である。新規の抗HIV-1創薬研究等に向け、Vifの機能とその責任領域の解明は急務である。Vifの作用機構に関しては、非許容細胞内標的分子APOBEC3G/Fの同定により、分子生物学的理解が飛躍的に進展してきている。本年度は、HIV-1 Vif内の良く保存されたアミノ酸残基に点変異を導入し、構築された多数の変異体の分子生物学的解析を行なうことで、HIV-1 Vif内のAPOBEC3G/F結合・反応領域の同定を試みた。

我々が世界に先駆けて構築したプロトタイプサル指向性HIV-1 (NL-DT5R) はSIVmac239の*vif*遺伝子全部と*gag*遺伝子のごく一部を持つ。NL-DT5Rは種々のサル細胞（カニクイザル由来HSC-F細胞、ブタオザル、アカゲザルおよびカニクイザル由来

PBMC) だけでなく、ブタオザル個体にも感染・増殖した (PNAS 103:16959-16964, 2006; J Virol 81:11549-11552, 2007; 未発表データ)。しかし、NL-DT5Rはサル病原性標準株であるSIVmac239よりサル細胞での増殖効率が悪く (PNAS 103:16959-16964, 2006)、また、ブタオザル感染個体でのウイルス血症も一過性であった (J Virol 81:11549-11552, 2007)。本年度は、HIV-1/マカクザル感染システムの確立を目指し、NL-DT5Rのゲノムを改変・修正してウイルス学的性状を改善するための基礎研究を行なった。

## ■ B. 研究方法

1. HIV-1 Vif (NL4-3) のN末端からC末端にかけて常法により点変異 (主としてアラニン置換) を導入し、合計26種類の変異体を構築した。これらの点変異体をヒト293T細胞やヒトリンパ球H9細胞を用い

て分子ウイルス学的に解析した (H9細胞での増殖能、VSV-G シュードウイルスの MAGI 感染価、細胞内発現量、APOBEC3G/F との結合能、ウイルス粒子内の APOBEC3G/F 取り込み量)。プロトタイプサル指向性 HIV-1 クローンである NL-DT5R (X4 ウイルス) のゲノムの改変とその R5 ウイルスバージョン NL-DT5R5-1 (SF162 の *env* 遺伝子を持つ) の構築も常法に従って行なった。感染細胞からの PCR 法による分子ウイルスクローンの構築も既報の通りである。

2. トランスフェクションとウイルス感染実験には、それぞれ 293T 細胞と H9 細胞およびサルリンパ球 HSC-F 細胞を用いた。HSC-F 細胞の感染実験は IL-2 存在下で行なった。トランスフェクションにはリン酸カルシウム法を用いた。ウイルス量は培養上清中の逆転写酵素 (RT) 活性により定量した。

3. ウイルスゲノムのシーケンスはアプライドバイオシステムのサイクルシーケンスキットを用いて決定した。

#### (倫理面への配慮)

本研究では、ヒトと動物を用いた研究は行っていない。

### ■ C. 研究結果

1. 構築した 26 種類の Vif 点変異体のうち、12 個が H9 細胞でのウイルス増殖が検出できないかあるいは増殖効率が有意に低下していた。このうち、3 クローンの変異は Cullin 5 結合部位として知られる C 末側の領域にあったが、他の 9 クローンの変異は N 末側に二ヶ所に分かれて存在した。アミノ酸残基 21-43 は、APOBEC3G 存在下の変異体の MAGI 感染価、変異体ウイルス粒子内の APOBEC3G 量および変異体と APOBEC3G との結合能 (免疫沈降法) から、APOBEC3G 結合領域と結論した。もう一つの領域 (アミノ酸残基 69-79) のうち、69 番目のアミノ酸は既に我々が報告している Vif の安定性に関わる領域内であったが、76 および 79 番目のアミノ酸は APOBEC3F 存在下における VSV-G シュードウイルスの MAGI 感染価から、Vif と APOBEC3F との相互作用に重要であることがわかった。76 および 79 番目のアミノ酸は実際に APOBEC3F との結合に関与していた (免疫沈降法)。さらに、上記の MAGI アッセイの結果から、APOBEC3G 結合領域の N 末側にも APOBEC3F との相互作用に重要な領域があることが明らかになった。

2. 遺伝子工学的手法を用いて NL-DT5R ゲノムを様々に改変し、*gag* あるいは *vif* に変異・組換えを持つウイルスクローンをそれぞれ 26 種類および 9 種類作製した。これら全てのクローンにつき、293T 細胞へのトランスフェクションでウイルスサンプルを調製し、HSC-F 細胞での感染・増殖効率を検討した。しかし、全てのクローンが親株 NL-DT5R よりも増殖が遅いか増殖不能のいずれかであった。NL-DT5R を親株とする R5 ウイルス NL-DT5R5-1 も CPE 惹起能は高いが増殖効率は非常に悪かった。

3. 上記の結果に基づき、NL-DT5R および NL-DT5R5-1 を用いて HSC-F 細胞でのウイルス馴化を試みた。ウイルス感染細胞の培養上清中に RT が検出されなくなってから新たに HSC-F 細胞を加えた。この処理により産生されてくるウイルスをストックし (感染開始から約二ヶ月後)、HSC-F 細胞での増殖効率を検討した。二つのウイルスサンプルとも NL-DT5R (オリジナル) より著しく、かつ、同程度に増殖効率が向上しており、細胞馴化が起きていることが強く示唆された。“馴化型”ウイルスが存在する感染細胞のゲノムから PCR 法にてウイルスゲノムを分子クローン化した。効率良く生物活性のあるクローンを取得するため、ウイルスゲノムを二つにわけて増幅し、かつ、得られた DNA を元の NL-DT5R に挿入した。ウイルスゲノムの 3 プライム側が X4 ウイルス由来のクローンを MN4、R5 ウイルス由来のクローンを MN5 と命名した。各クローンの HSC-F 細胞における増殖速度を比較検討した結果、NL-DT5R より著しく早いクローンがそれぞれ複数得られた。これらは HSC-F 細胞における CPE の出現も早くかつ増強されていた。

4. 最も増殖効率の良いクローンのゲノムシーケンスを決定した。NL-DT5R についての報告 (PNAS 103:16959-16964, 2006) と同様に、親株からの変異は LTR と *gag* (MA)、*pol*、*vif*、*vpr*、*env* および *nef* 遺伝子に少数認められたのみであった。MN4/MN5 クローンに共通して見られる変異の存在する領域 (同一の変異ではない) は LTR、*pol* (IN)、*vif* (アミノ酸置換を伴わない変異) および *env* (SU) であった。

### ■ D. 考察

HIV-1 Vif が抗ウイルス細胞因子 APOBEC3G を中和するメカニズムは既におおよそ明らかにされている。Vif は APOBEC3G と結合してこれを分解し、最終的にウイルス粒子中への APOBEC3G の取り込みを著しく抑制する。実際、この分解に関わる Vif 内

のCullin 5結合部位（C末端側に存在）も明らかにされている。本研究では、詳細な分子遺伝学的解析により、VifのN末端側にAPOBEC3G/F結合領域（G/Fで領域が異なる）があることを新たに示した。APOBEC3G/Fの中和活性に必要なVifの領域は一部異なるが重なっており、VifとAPOBEC3G/Fとがどのように複合体を形成するか知るためには更なる解析が必要である。Vifの立体構造が解明されれば、詳細な分子モデルの構築が可能となる。

HIV-1の基礎・臨床研究を格段に進展させるためには、SIVやSHIVではなくHIV-1そのものを用いたサル感染・発症モデルが必要である。このシステムが確立できれば、長い間不可能であった（1）HIV-1の病原性発現機構の解析、（2）分子・細胞レベルでは不明の点の多いHIV-1アクセサリー蛋白質の個体内機能の解析、（3）HIV-1感染症の制御に繋がる新薬/ワクチンの評価・開発研究が実現可能となる。本研究で得られたHIV-1の分子クローンMN4/MN5はこの目標の基礎となり得る。

## ■E. 結論

本研究により、HIV-1 VifのN末端側に抗ウイルス細胞因子APOBEC3G/Fとの結合領域が存在することが明確に示され、新しい抗HIV-1薬開発の可能性が提示された。さらに、プロトタイプサル指向性HIV-1（NL-DT5Rクローン）より増殖効率等で格段に優れたMN4/MN5分子クローンが得られたことで、HIV-1/マカクザル感染システムの確立に向け大きく前進したと考えられる。馴化に伴う共通な変異領域としてはLTR、IN、SUおよびVifがあり、サル細胞での増殖能に関連して特に注目される。

## ■F. 健康危険情報

該当事項なし。

## ■G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Piroozmand, A., Yamamoto, Y., Khamsri, B., Fujita, M., Uchiyama, T., and Adachi, A. 2007. Generation and characterization of APOBEC3G-positive 293T cells for HIV-1 Vif study. *Journal of Medical Investigation* 54: 154-158.
2. Igarashi, T., Iyengar, R., Byrum, R.A., Buckler-White, A., Dewar, R.L., Buckler, C.E., Lane, H.C., Kamada, K., Adachi, A., and Martin, M.A. 2007. An HIV-1 derivative with 7% SIV genetic content is able to establish infections in pig-tailed macaques. *Journal of Virology* 81: 11549-11552.
3. 足立昭夫、鎌田和弥、八町和樹、山下知輝、内山恒夫、野間口雅子. 2007. HIV-1の病原性と

アクセサリー遺伝子. *蛋白質核酸酵素*, 52: 1261-1267.

4. Nomaguchi, M., Doi, N., Kamada, K., and Adachi, A. 2008. Species barrier of HIV-1 and its jumping by virus engineering. *Reviews in Medical Virology* (In press).
5. Nomaguchi, M., and Adachi, A. 2008. Role of HIV-1 Vpu protein for virus spread and pathogenesis. *Microbes and Infection* (Invited).

## 2. 学会発表

1. Akio Adachi, Kazuya Kamada, Boonruang Khamsri, Kazuki Hatcho, Naoya Doi, Tomoki Yamashita, Tsuneo Uchiyama and Masako Nomaguchi. Generation and characterization of monkey-tropic HIV-1: evasion from antiviral factors. The 7th Awaji International Forum on Infection and Immunity, 2007, Awaji, Japan.
2. 山下知輝、八町和樹、鎌田和弥、Boonruang Khamsri、野間口雅子、足立昭夫. HIV-1 Vifと宿主因子APOBEC3Fとの結合機能部位の解析. 第55回日本ウイルス学会、2007年、札幌市.
3. 八町和樹、鎌田和弥、山下知輝、Boonruang Khamsri、土肥直哉、野間口雅子、足立昭夫. HIV-1 Vif種特異性決定領域の解析とサル感染性HIV-1作製への応用. 第55回日本ウイルス学会、2007年、札幌市.
4. 足立昭夫、鎌田和弥、八町和樹、土肥直哉、Boonruang Khamsri、山下知輝、野間口雅子. HIV-1 DTクローンの細胞および個体レベルでの増殖能. 第55回日本ウイルス学会、2007年、札幌市.
5. 野間口雅子、足立昭夫. 粒子放出能に関するVpuの点変異体解析. 第21回日本エイズ学会、2007年、広島市.
6. 足立昭夫. HIV-1の種特異的増殖. 第21回日本エイズ学会教育講演、2007年、広島市.

## ■H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

### 1. 特許取得

なし。

### 2. 実用新案登録

なし。

### 3. その他

なし。



## 分担研究課題



## HIV-1のpol遺伝子を持つ新規SHIVを用いたサルへのHAARTモデルの開発

協力研究者  
井戸 栄治

京都大学ウイルス研究所 新興ウイルス感染症研究センター 准教授

抗HIV薬をin vivoレベルで評価できる系を確立することを目的として、薬剤の多くが標的とするpol遺伝子をHIV-1由来にした種々の新規SHIVを作成し、それらのサル感染実験を行った。本年度は特に、RTとINT遺伝子のみをHIV-1由来にしたSHIV-rti、並びにPRからINT遺伝子までpol遺伝子の全領域をHIV-1由来にしたSHIV-prtiについてサル感染実験を行なった結果、前者はエイズ発症を引き起こし、後者はサル個体のin vivo継代によって感染増殖能を増強しつつあることが判った。

### ■ A. 研究目的

抗HIV-1薬剤の複数使用によるHAART療法を臨床適用の前に動物実験レベルで評価できれば、新薬の評価や好適な薬剤の組み合わせの探索など、より良い治療法の開発がヒトに対するリスクを犯すことなく進められる。しかし通常実験動物に用いられるサルにはHIV-1は感染せず、また持続感染することが知られている従来型のSHIVは、抗ウイルス増殖阻害剤が主に標的とするpol遺伝子部分がSIV由来のため、そのような評価には必ずしも適さない。そこで我々は、SIVmacのゲノムにPR、RT、INT遺伝子をHIV-1由来に置換した一連の新規SHIVを作成し、これによるアカゲザル感染モデル系を確立し、各種ウイルス複製阻害剤によるHAART療法を開発することを目的とする。

### ■ B. 研究方法

本年度は、HIV-1とSIVの分子クローンを出発材料に、RTとINT遺伝子のみをHIV-1由来にしたSHIV-rtiと、ほぼpolの全領域（即ちPRとRTおよびINT遺伝子）をHIV-1由来にしたSHIV-prtiを作成し、それらのアカゲザルへの接種実験を行った。

### ■ C. 研究結果

SHIV-rtiを2頭のアカゲザルに静脈内接種したところ、2頭共にウイルスが分離され、それが比較的長期間持続した。抗体応答は特に1頭のMM402で顕

著に見られ、このサルからはウイルスがよく分離されている。接種後1年半を過ぎた辺りより、血中のウイルス量が急激に増加し、 $10^5$  copies/mlを超え、またCD4陽性リンパ球数並びに体重がそれに応ずるように減少し始めてた。エイズ発症と考えられる。また、SHIV-prtiについてはプラスミドのトランスフェクション上清をそのままを使うとサル細胞での増殖が必ずしも良好ではなかったため（ピークが20日目前後）、HSC-F細胞を用いた細胞培養による継代を10代続け、さらにサル細胞への馴化を計った。その結果増殖の立ち上がりが早くなったので（ピークが10日目前後になった）、これを2頭のアカゲザルに静脈内接種したところ、特に内1頭からのウイルス分離の成績が良好であった。しかし抗体応答は2頭共に低いままで、血中ウイルス量の価も $10^3 \sim 10^4$  copies/mlの程度であった。増殖能向上を目指して、このサルから2代目、さらには3代目へと血液および再分離ウイルスを用いてin vivo継代を行ったところ、代を重ねるに従ってウイルス量が増加し、抗体応答も顕著に見られるようになった。

### ■ D. 考察

上記の成績より、SHIV-rtiとSHIV-prtiは基本的にサル個体において感染増殖が可能であることが示された。SHIV-rtiについては、1代目にして持続感染状態になったので、RTやINT阻害剤の投与実験を直ちに行えると考えられた。SHIV-prtiについては、ま

だそれほどの高い増殖能力は示しておらず、今後個体レベルで薬剤評価に使用できるような高い血中ウイルス量を維持できる持続感染成立を目指すには、さらに一段のサル個体への馴化が必要と思われた。

## ■E. 結論

SHIV-prtiがサル個体において持続感染状態になる日はそう遠くないと考えられる。このウイルスが感染したサルを用いて、PR, RT, INTの各阻害剤の併用による文字通りのHAART療法は十分実現可能と思われた。

## ■F. 研究発表

### 1. 論文発表

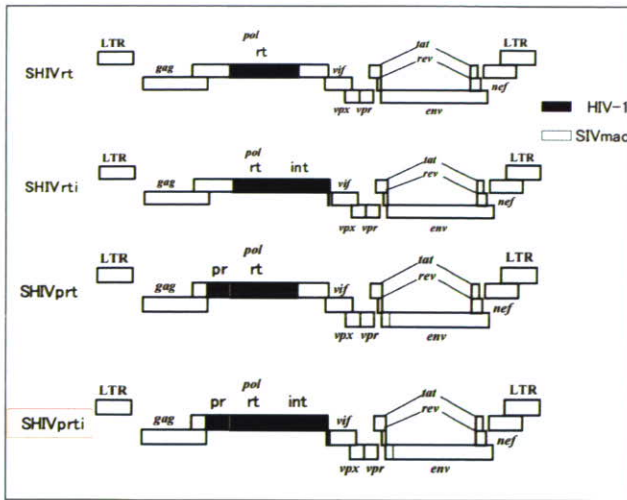
Ishimatsu, M., Suzuki, H., Akiyama, H., Miura, T., Hayami, M., Ido, E.: Construction of a novel SHIV having an HIV-1-derived protease gene and its infection to rhesus macaques: a useful tool for in vivo efficacy tests of protease inhibitors. *Microbes Infection*, 9(4):475-482, 2007.

### 2. 学会発表

1. Ishimatsu, M., Suzuki, H., Akiyama, H., Hayami, M., Miura, T., Ido, E.: Evaluation of a novel SHIV having an HIV-1-derived pr gene / macaque model for protease inhibitors. 21st Century COE Program 'The Active Exchange of Young Scientists' Research across Borders and between Fields', Kyoto, February 28-March 1, 2007.
2. Ido, E.: Generation of novel SHIVs that possess HIV-1-derived pol genes: Useful tools for animal HAART model. Abstract Book p.86, 8th Annual Symposium on Antiviral Drug Resistance: Targets and Mechanisms, Richmond, U.S.A, November 11-14, 2007.
3. 井戸栄治、石松美沙、三浦智行：プロテアーゼ、逆転写酵素、およびインテグラーゼの各遺伝子がHIV-1由来であるSHIV-prtiのサルにおけるin vivo継代、第21回日本エイズ学会学術集会・総会、広島、11月28日-11月30日、2007.
4. 石松美沙、鈴木 元、秋山尚志、三浦智行、速水正憲、井戸栄治：SIVmacにHIV-1のプロテアーゼ遺伝子を組み込んだSHIV-prのin vivo継代によって生じた遺伝子変異の解析、第21回日本エイズ学会学術集会・総会、広島、11月28日-11月30日、2007.

## ■G. 知的財産権の出願・登録状況

特になし。



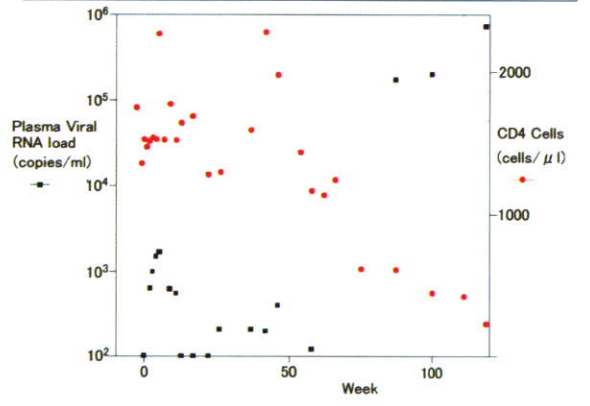
**Virus isolation and PA antibody titers in SHIV-rti-infected rhesus monkeys**

Week	0	1	2	3	4	6	8	10	12	16	21	25	36	41	61	99	110
<b>Virus isolation</b>																	
MM402	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+
MM403	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	Died
<b>PA antibody (Genedia HIV-1/2)</b>																	
MM402	<32	<32	<32	<32	<32	<32	32	256	1024	2048	4096	4096	4096	4096	<16384	<16384	<16384
MM403	<32	<32	<32	<32	<32	<32	<32	32	64	32	32	32	32	32	32	32	64

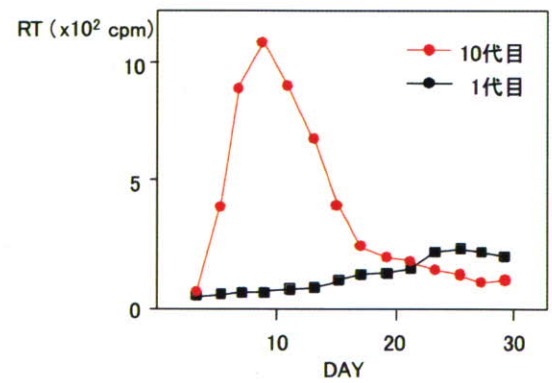
**Plasma viral RNA loads**

Plasma viral RNA loads for both monkeys maintained with a range of  $10^2$ – $10^4$  copies/ml at 2 w.p.i. to 4 w.p.i. and decreased thereafter. However, the RNA loads greatly increased after one and half years post inoculation of the virus.

**SHIV-rti感染ザルの血中ウイルス量とCD4細胞数の変動**



**HSC-F (サル由来細胞株)における in vitro 継代によるウイルス増殖能の増加**



**Virus isolation and PA antibody titers in SHIV-pti(p)-infected rhesus monkeys**

Week	0	1	2	3	4	8	12	26	35	52
<b>Virus isolation</b>										
MM317	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MM333	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-
<b>PA antibody (Genedia HIV-1/2)</b>										
MM317	<32	<32	<32	<32	<32	<32	<32	32	32	32
MM333	<32	<32	<32	<32	<32	<32	<32	32	32	32

↓  
**in vivo 継代へ**

**Virus isolation and PA antibody titers in SHIV-pti(2)-infected rhesus monkeys**

Week	0	1	2	3	6	8	16	28	40	52
<b>Virus isolation</b>										
MM466	-	+	-	-	-	+	+	+	+	NT
MM467	-	+	+	+	-	+	+	+	+	NT
<b>PA antibody (Genedia HIV-1/2)</b>										
MM466	<32	<32	<32	<32	ND	<32	32	32	32	32
MM467	<32	<32	<32	<32	ND	128	256	256	512	1024

## 研究成果の刊行物に関する一覧表



## 書籍

著者氏名	論文 タイトル名	書籍全体の 編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
杉浦 互	感染症の治 療と薬剤耐 性.		生体防御医学辞典.	朝倉書店		2007	66-71

## 雑誌

発表者氏名	論文タイトル	発表誌名	巻号	ページ	出版年
H Suzuki, M Fujino, M Matsuda, H Yan, Y Iwatani, W Sugiura.	Effects of Protease and reverse transcriptase inhibitor-resistance mutations on integrase polymorphism in multidrug resistance cases.	Antiviral Therapy.	12(1)	S4	2007
J Shibata, F Ren, M Nishizawa, M Fujino, Y Iwatani, M Matsuda, H Miura, H Tanaka and W Sugiura.	Interference between Gag non-cleavage site mutation P453L and HIV-1 protease non-drug resistance mutation E35D.	Antiviral Therapy.	12(1)	S143	2007
Okuma K, Tanaka R, Ogura T, Ito M, Kumakura S, Yanaka M, Nishizawa M, Sugiura W, Yamamoto N, Tanaka Y.	Interleukin-4-Transgenic hu-PBL-SCID Mice: A Model for the Screening of Antiviral Drugs and Immunotherapeutic Agents against X4 HIV-1 Viruses.	J Infect Dis.	Jan 1;197(1)	134-41	2008

Saeng-Aroon S, Yoshida LM, Ariyoshi K, Taguchi M, Pathipvanich P, Rojanawiwat A, Matsuda M, Kannagi M, Sawanpanyalert P, Sugiura W, Auwanit W.	An Efficient Tool for Surveying CRF01_AE HIV Type 1 Resistance in Thailand to Combined Stavudine-Lamivudine -Nevirapine Treatment: Mutagenically Separated PCR Targeting M184I/V.	AIDS Res Hum Retroviruses.	Dec;23(12)	1461-8	2007
Satoh E, Li XK, Hara Y, Ogata K, Guo L, Kitazawa Y, Funeshima-Fuji N, Satoh T, Miyagi T, Sugiura W, Yamamoto N, Teramoto K, Arie S, Kimura H.	Sensitization to enhanced green fluorescence protein minor histocompatibility antigen by gene transduction into dendritic cells and peritoneal exudate macrophages.	Transpl Immunol.	Nov;18(2)	73-84	2007
Iwatani Y, Chan DS, Wang F, Maynard KS, Sugiura W, Gronenborn AM, Rouzina I, Williams MC, Musier-Forsyth K, Levin JG.	Deaminase-independe nt inhibition of HIV-1 reverse transcription by APOBEC3G.	Nucleic Acids Res.	35(21)	7096-108	2007

Seiichiro Fujisaki, Saeko Fujisaki, Shiro Ibe, Tsukasa Asagi, Toshihiro Itoh, Shigeru Yoshida, Takao Koike, Masayasu Oie, Makiko Kondo, Kenji Sadamasu, Mami Nagashima, Hiroyuki Gatanaga, Masakazu Matsuda, Mikio Ueda, Aki Masakane, Mami Hata, Yasushi Mizogami, Haruyo Mori, Rumi Minami, Kiyomi Okada, Kanako Watanabe, Takuma Shirasaka, Shinichi Oka, Wataru Suigura and Tsuguhiro Kaneda.	Performance and Quality Assurance of Genotypic Drug-Resistance Testing for Human Immunodeficiency Virus Type 1 in Japan. Jpn.	J.Infect. Dis.	60	113-117	2007
Ode H, Matsuyama S, Hata M, Hoshino T, Kakizawa J, Sugiura W.	Mechanism of drug resistance due to N88S in CRF01_AE HIV-1 protease, analyzed by molecular dynamics simulations.	J Med Chem.	19:50(8)	1768-77	2007
Chiba-Mizutani T, Miura H, Matsuda M, Matsuda Z, Yokomaku Y, Miyauchi K, Nishizawa M, Yamamoto N, Sugiura W.	Use of new T-cell-based cell lines expressing two luciferase reporters for accurately evaluating susceptibility to anti-human immunodeficiency virus type 1 drugs.	J Clin Microbiol.	45(2)	477-87	2007

Makiko Hamatake, Masako Nishizawa, Naoki Yamamoto, Shingo Kato, Wataru Sugiura.	A simple competitive RT-PCR assay for quantitation of HIV-1 subtype B and non-BRNA in plasma.	J Virol Methods.	142	113-7	2007
Hiroyuki Gatanaga, Shiro Ibe, Masakazu Matsuda, Shigeru Yoshida, Tsukasa Asagi, Makiko Kondo, Kenji Sadamasu, Hiroki Tsukada, Aki Masakane, Haruyo Mori, Noboru Takata, Itsuhiro Nakagiri, Rumi Minami, Masao Tateyama, Takao Koike, Toshihiro Itoh, Mitsunobu Imai, Fumitake Gejyo, Mikio Ueda, Motohiro Hamaguchi, Yoko Kojima, Takuma Shirasaka, Akiro Kimura, Masahiro Yamamoto, Jiro Fujita, Shinichi Oka, and Wataru Sugiura.	Nationwide Survey of Drug-Resistant HIV-1 Prevalence in Patients Newly Diagnosed with HIV/AIDS in Japan.	Antiviral Research	75(1)	75-82	2007
K.Furuya, M.Omura, S.Kudo, W. Sugiura, H. Azuma.	Recognition Profiles of microsporidian Encephalitozoon cuniculi polar tube protein 1 with human immunoglobulin M antibodies.	Parasite Immunology.	30	13-21	2008