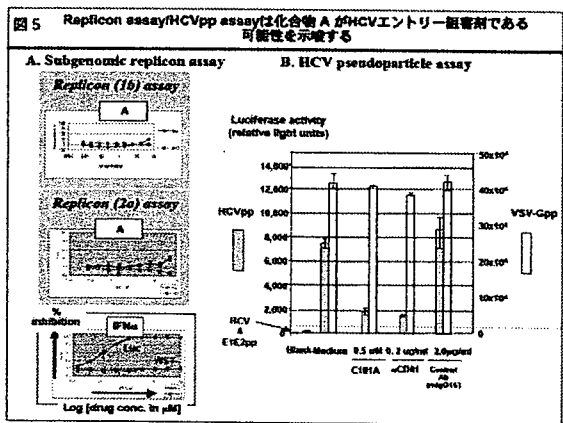
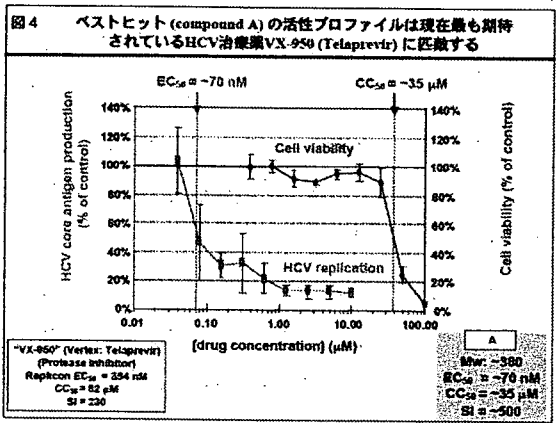
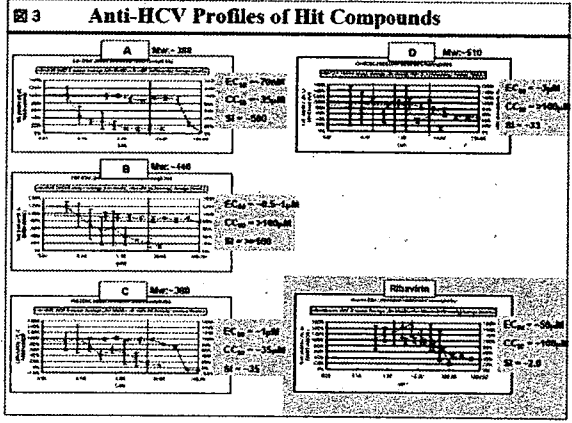
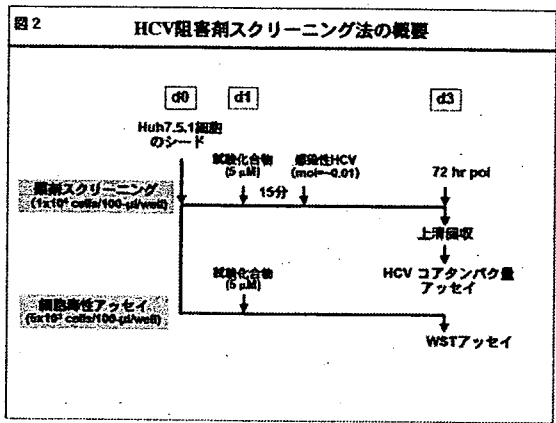
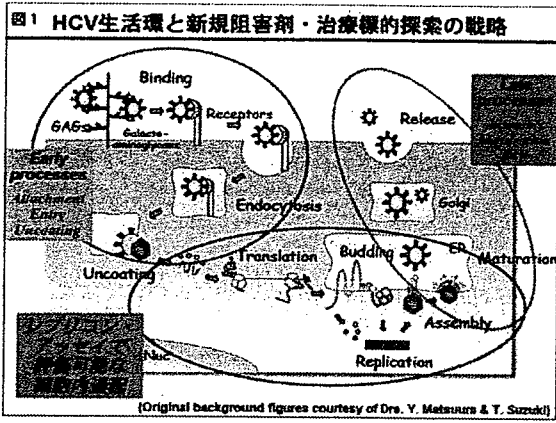


- Jeang). *Advances in Pharmacology* vol. 56: 1-25, 2008.
2. Tee, K. K., Pybus, O.G., Liao, H., Uenishi, R., Hase, S., Kamarulzaman, A., Li, X-J., and Takebe, Y. Chronology of the HIV-1 CRF07_BC expansion in East-Asia. *AIDS* 22: 156-158, 2007.
 3. Li, X-J., Uenishi, R., Hase, S., Liao, H., Tee, K. K., Kusagawa, S., and Takebe, Y. HIV/AIDS in Asia: The shape of epidemics and their molecular epidemiology. *Virologica Sinica* 22 (6): 426-433, 2007.
 4. Han, X., Zhang, M., Dai, D., Wang, Y., Zhang, Z., Liu, J., Geng, W., Jiang, Y., Takebe, Y., and Shang, H. Genotypic resistance mutations to antiretroviral drugs in treatment-naive HIV/AIDS patients living in Liaoning Province, China: baseline prevalence and subtype-specific difference. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 23 (3): 357-364, 2007.
 5. Utsumi, T., Nagakawa, H., Uenishi, R., Kusagawa, S., and Takebe, Y. An HIV-2-infected Japanese man who was a long-term nonprogressor for 36 years. *AIDS* 21 (13): 1834-1835, 2007.
 6. Naito, Y., Nohtomi, K., Onogi, T., Uenishi, R., Ui-Tei, K., Saigo, K., and Takebe, Y. Optimal design and validation of antiviral siRNA for targeting HIV-1. *Retrovirology*. 4 (1): 80, 2007.
 7. Shimizu, S., Urano, E., Futahashi, Y., Miyauchi, K., Isogai, M., Matsuda, Z., Nohtomi, K., Onogi, T., Takebe, Y., Yamamoto, N., and Komano, J. Inhibiting lentiviral replication by HEXIM1, a cellular negative regulator of the CDK9/cyclin T complex. *AIDS* 21: 575-582, 2007.
 8. Tee, K. K., Li, X.-J., Nohtomi, K., Ng, K. P., Kamarulzaman, A., and Takebe, Y. Identification of a novel circulating recombinant form (CRF33_01B) disseminating widely among various risk populations in Kuala Lumpur, Malaysia. *J. AIDS* 43 (5): 523-9, 2006.
 9. Murakami, Y., Yamagoe, S., Noguchi, K., Takebe, Y., Uehara, Y. and Fukazawa, H. Ets-1-dependent expression of vascular endothelial growth factor receptors is activated by Latency-associated nuclear antigen of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus through interaction with Daxx. *J. Biol. Chem.* 281 (38): 28113-28121, 2006.
 10. Takebe, Y. and Telesnitsky, A. Evidence for the acquisition of multidrug resistance by an HIV clinical isolate *via* human sequence transduction. *Virology* 351: 1-6, 2006.
 11. Naito, Y., Ui-Tei, K., Nishikawa, T., Takebe, Y., Saigo, K. siVirus: web-based antiviral siRNA design software for highly divergent viral sequences. *Nucl. Acid Res.* (Web Server issue) W448-W450, 2006.
- 和文
12. 長谷彩希、草川茂、武部豊. 逆転写酵素活性測定法-³²P を用いた免疫不全ウイルス (HIV) のウイルス学的研究技術. 秀潤社: 細胞工学別冊 RI の逆襲; アイソトープを活用した簡単・安全バイオ実験.

- 127-131, 2007.
13. 武部豊. HIV サブタイプと感染経路. 治療. 88(12): 2843-2851, 2006.
2. 学会発表 (2007-2008)
1. Isogai, M., Uenishi, R., Hase, S., Suzuki, R., Suzuki, T., Wakita, T., and Takebe, Y. Identification of new class of HCV inhibitors targeting to the entry or late stages in HCV replication cycle using newly developed JFH-1-based infectivity/replication assay. HCV 2007 (Sept. 9-13, 2007, Glasgow, UK).
2. Takebe, Y. Identification of novel antiviral small molecule compounds that are likely to block early processes in HCV replication cycle. 2nd Hepatitis C, resistance and new compounds workshop (Oct 31-Nov 1, 2007, Boston)
3. Uenishi, R., Nohtomi, K., Hase, S., Suzuki, R., Suzuki, T., and Wakita, T., and Takebe, Y. Identification of new class of HCV inhibitors using newly developed JFH-1-based infectivity/replication assay. 第7回あわじしま感染症・免疫フォーラム (Sept. 1-5, 2007, 淡路島)
4. 武部豊、上西理恵、納富香子、長谷彩希、鈴木哲朗、脇田隆宇. 感染性 HCV クローン JFH-1 を用いた感染・増殖アッセイに基づくスクリーニングによる新規標的をもつ HCV 阻害剤の同定とその解析. 第55回日本ウイルス学会 (2007. 10. 20-23, 札幌)
5. 上西理恵、納富香子、長谷彩希、鈴木哲朗、鈴木亮介、脇田隆宇、武部豊. 新規阻害剤探索のための HCV 感染・増殖アッセイ系の樹立とその評価. 第55回日本ウイルス学会学術集会総会 (2007. 10. 20-23, 札幌)

- H. 知的財産権の出願・登録状況 (2005-2008)
- 特許出願 (準備中を含む)
1. 特許取得・出願
- 1) 「HCV 阻害剤」(出願準備中)
- 2) 「新規 HCV エントリー阻害剤」(特願 2008-33598、平成 20 (2008) 年 2 月 14 日出願)
- 3) 「HIV-1 特異的 RNA 干渉分子」(特願 2007-156767、平成 19 年 6 月 13 日出願)
- 4) 「C 型肝炎ウイルス (HCV) 増殖阻害剤」(特願 2007-018145、平成 19 年 1 月 29 日)[PCT 出願: PCT/JP2008/51086 (Jan 25, 2008)]
- 5) 「C 型肝炎ウイルス阻害剤を検出するためのアッセイ方法」(特願 2006-351809、平成 18 年 12 月 27 日出願)
- 6) 「RNA 干渉ポリヌクレオチド混合物の設計方法、RNA 干渉ポリヌクレオチド混合物の設計装置、RNA 干渉ポリヌクレオチド混合物の作製方法、RNA 干渉ポリヌクレオチド混合物の設計プログラム、及び RNA 干渉ポリヌクレオチド混合物」(特願 2005-55064、平成 17 年 2 月 28 日出願)
- 7) 「弱毒型 HIV-1 塩基配列」(特願 2005-08741、平成 17 年 1 月 17 日出願)
2. 実用新案登録 該当無し
3. その他 該当無し



分担研究報告書

栄養成分の HCV に及ぼす効果の検討

分担研究者 岡山大学 准教授 池田 正徳

研究要旨 全長 HCV RNA (1b 型 HCV-0 株) の複製レベルを迅速かつ正確に定量できる OR6 細胞レポーターアッセイ系を用いて、日常的に摂取する栄養成分の HCV RNA 複製に及ぼす効果を検討し、以下のような結果を得た。(1) 検討した 46 種類の栄養成分のうち細胞増殖に影響を与えない濃度で、β-カロテン、ビタミン D2、リノール酸の 3 成分が濃度依存的に HCV RNA の複製を抑制することを明らかにした。(2) ビタミン A、C、K、E は HCV RNA の複製を増強してしまうことを示した。(3) 抗 HCV 効果を示した 3 成分とインターフェロンあるいはフルバスタチンとの併用では相加効果を、サイクロスポリン A との併用では相乗効果を示すことを示した。以上の結果、日常的に摂取する栄養成分には C 型慢性肝炎の治療を補助する可能性があることを示した。

A. 研究目的

C 型肝炎ウイルス (HCV) 感染は高率に慢性肝炎となり、致死的な肝硬変、肝癌へと進行する。肝硬変、肝癌に対する決定的な治療法がない現状では、C 型慢性肝炎患者からウイルスを排除することがこの連鎖を断ち切る最善の治療戦略と思われる。インターフェロン (IFN) 療法は改善され、現在ペグ IFN とリバビリンの併用が標準的な治療法となっているがその治癒率は約 50%にとどまっている。

昨今ではサプリメントの効能に関する情報が氾濫しているが、その多くが過剰な期待を抱かせるものであり、また、科学的な検証を経ていない。日常的に摂取している栄養成分が C 型肝炎ウイルスに及ぼす影響についてはこれまで、十分な検討がなされていない。HCV RNA の複製を抑制するような栄養成分が同定できれば、IFN 療法の効果を補助することが可能となる。また、HCV RNA の複製を増

強する栄養成分の過剰な摂取は IFN 療法の効果を気付かぬうちに減弱させてしまうかもしれない。

本研究では、レポーターを含む全長 HCV RNA 複製細胞 (OR6 アッセイシステム) を用いて日常的に摂取する栄養成分の HCV RNA の複製に及ぼす効果を明らかにする目的で以下のような実験を行った。

B. 研究方法

HCV-0 株 (遺伝子型 1b) 由来の全長 HCV RNA 複製細胞 (OR6 細胞) を用いて栄養成分の HCV RNA 複製に及ぼす効果を検討した。OR6 細胞はレニラルシフェラーゼ遺伝子、ネオマイシン耐性遺伝子を含む全長 HCV RNA をヒト肝癌細胞株である HuH-7 細胞に導入後、薬剤選択により得られたクローン化細胞株である。OR6 細胞ではレニラルシフェラーゼ活性を測定することで HCV RNA の複製レベルを評価することが可能である (OR6 アッセイシステム)。

本研究では18種類のビタミン類、6種類のアミノ酸、11種類の脂肪酸、11種類の無機塩類についてHCV RNA複製に及ぼす効果をOR6アクセスシステムで評価した。ビタミン類として、 β -カロテン、ビタミンA、B1、B2、B3、B6、B12、C、E、K1、K2、K3、ビオチン、パントテン酸、イノシトール、葉酸を用いた。アミノ酸として、トリプトファン、ロイシン、イソロイシン、バリン、チロシン、フェニールアラニンを用いた。脂肪酸として、リノール酸、アラキドン酸、エイコサペンタエン酸、ドコサヘキサエン酸、ラウリン酸、パルミチン酸、ステアリン酸、ベヘン酸、オレイン酸、エライジン酸、バクセン酸を用いた。無機塩類としては、Fe(II)SO₄、Fe(III)(NO₃)₂、ZnCl₂、Na₂SeO₄、NaCl、KCl、CaCl₂、PCl₃、MgCl₂、CuCl₂、MnCl₂を用いた。

各栄養成分をOR6細胞に添加する24時間前に、OR6細胞を1ウエルあたり2x10⁴ずつ24ウエルプレートに蒔きこんだ。濃度を変えて各栄養成分を細胞に添加して72時間培養を行った。細胞を回収し、レニラルシフェラーゼ活性を測定した。

各栄養成分が細胞増殖に影響を与えない濃度については栄養成分をOR6細胞に添加後72時間培養し、トリパンブルー染色で生細胞を数えて栄養成分を添加していないコントロール細胞と比較し決定した。

HCV RNA複製に対して抑制効果のある栄養成分に関しては、これまでに抗HCV効果の報告されている、IFN- α 、フルバスタチン、サイクロスポリンAとの併用効果について検討した。

OR6細胞で複製するHCV RNAには外来性の遺伝子であるレニラルシフェラーゼ遺伝子、ネオマイシン耐性遺伝子、脳心筋炎ウイルスの

internalsribosomal entry siteの遺伝子が含まれている。栄養成分がこれらの外来性遺伝子に影響を与える可能性を否定するため、本来の全長HCV RNA (HCV-0株)を導入したHCV RNA複製細胞を用いて、栄養成分の効果を検討した。

(倫理面への配慮)

本研究で実験に用いられた材料は全てこれまでに確立されているものであり、新たに用いた臨床材料はない。そのため、倫理面への特段の配慮はなかった。

C. 研究結果

46種類の栄養成分についてHCV RNAの複製に及ぼす効果を検討した。HCV RNA複製に対して抑制効果を示したのは、 β -カロテン、ビタミンD₂、リノール酸、アラキドン酸、エイコサペンタエン酸、ドコサヘキサエン酸、Fe(II)SO₄、Fe(III)(NO₃)₂、ZnCl₂の9種類であった。一方、HCV RNA複製に対して増強効果があったのは、ビタミンA、C、E、K1、K2、K3、トリプトファン、Na₂SeO₄の8種類であった。残りの29種類の栄養成分はHCV RNA複製に対して影響を与えなかった。これらの結果は、日常的に摂取している栄養成分のほとんどはHCV RNA複製に影響を及ぼさないが、一部の栄養成分はHCV RNA複製に対して抑制あるいは増強効果を有することを示している。

HCV RNA複製に対して細胞増殖に及ぼす効果を検討した。リノール酸、アラキドン酸、エイコサペンタエン酸、ドコサヘキサエン酸などの多価不飽和脂肪酸についてはこれまでに抗HCV効果が報告されている。しかし、今回、OR6細胞で抗HCV効果を示した多価不飽和脂肪酸のうちリノール酸

以外の多価不飽和脂肪酸では50 μ M以上の濃度で細胞増殖の抑制を認めた。抗HCV効果を示した3種類の無機塩類では、50%抑制効果を示す濃度までは細胞増殖に影響を認めなかった。しかし、50%抑制効果を示す濃度よりも高い濃度では細胞増殖の抑制を認めた。これらの結果を踏まえて、以後の解析には β -カロテン、ビタミンD2、リノール酸の3成分を用いて行った。

β -カロテン、ビタミンD2、リノール酸のEC50はそれぞれ、6.3 μ M、3.8 μ M、20.2 μ Mであった。

HCV RNA複製に抑制あるいは、増強効果を示した、栄養成分については、外来性遺伝子を含まない本来の全長HCV RNAが複製する細胞を用いてHCVのCore蛋白質の発現に対してウエスタンブロット解析を行ったが、濃度依存的な抑制効果あるいは、増強効果を確認した。このことは、HCV RNA複製に影響を及ぼした栄養成分の効果が外来性の遺伝子あるいは遺伝子産物ではなくHCV RNA複製を抑制していることを示している。

β -カロテン、ビタミンD2、リノール酸をこれまでに抗HCV効果の報告がされているIFN- α 、フルバスタチン、サイクロスポリンAと併用した時の効果について検討した。2種類の物質を濃度を変えて同時にOR6細胞に添加したときのEC50をプロットして得られたIsobole plotにより相反、相加、相乗効果を判定した。IFN- α に各栄養成分を併用した時相加効果が認められた。フルバスタチンに各栄養成分を併用した時にも相加効果が認められた。一方、サイクロスポリンAに各栄養成分を併用した時には、相乗効果が認められた。これらの結果は β -カロテン、ビタミンD2、リノール酸は、既存の抗HCV効果の認められている薬剤の効果を補助し増強させる可能性を示唆している。

栄養成分には β -カロテン、ビタミンD2、リノール酸のように抗HCV効果を示すものがあるが、一方では、ビタミンA、C、K、EのようにHCV RNAの複製を増強してしまうものも存在する。HCV RNAの複製を増強する栄養成分のうちビタミンEを用いて、 β -カロテン、ビタミンD2、リノール酸の抗HCV効果に及ぼす効果について検討した。ビタミンEは β -カロテン、ビタミンD2、リノール酸の抗HCV効果を減弱させてしまうことが分かった。抗HCV効果の知られているIFN- α 、IFN- β 、フルバスタチン、サイクロスポリンAの抗HCV効果にたいするビタミンEの効果についても検討した。サイクロスポリンAの抗HCV効果はビタミンEにより減弱した。一方、IFN- α 、IFN- β 、フルバスタチンの抗HCV効果はビタミンEの影響を受けなかった。以上の結果はビタミンEの代わりにセレンウムを用いた実験でも同様であった。これらのことは、 β -カロテン、ビタミンD2、リノール酸、サイクロスポリンAの抗HCV効果には酸化ストレスの関与が示唆された。

D. 考察

これまでに、日常的に摂取する栄養成分のHCV RNA複製に及ぼす効果の検討は多価不飽和脂肪酸、鉄などに限られており網羅的な検討はなされていない。本研究では、ビタミン、アミノ酸、脂肪酸、無機塩類からなる46種類の栄養成分のHCV RNA複製に及ぼす効果についてレポータ遺伝子を含む全長HCV RNA複製細胞(OR6細胞)を用いて検討した。ほとんどの栄養成分はHCV RNA複製に影響を与えなかったが、細胞増殖に影響を与えない濃度で β -カロテン、ビタミンD2、リノール酸はHCV RNA複製を抑制することがわかった。一方、ビタミンA、

C、K、E、トリプトファン、セレンウムはHCV RNA複製を増強することがわかった。通常の食事ではHCV RNA複製を抑制するものと促進するものが混在しており、HCV RNA複製に及ぼす効果は相殺されてしまっているものと思われる。HCV RNA複製を抑制するβ-カロテン、ビタミンD2、リノール酸だけでは強力な抗HCV効果は期待できないが、IFN-αの効果を増強することより、IFN治療の補助剤としての役割が期待できるものと思われる。

昨今のサプリメントブームで抗酸化物質は酸化ストレスから細胞を守る機能から過剰に摂取されていることも多い。しかしながら、ビタミンC、Eやセレンウムなどの抗酸化剤として知られるものは本研究で明らかのようにHCV RNA複製を増強してしまいHCVの治療の観点からはむしろマイナスの効果をもたらす可能性があるために注意しなければならない。

本研究はいままであまり注目されていなかった栄養学的側面からHCV RNA複製について解析したもので、現在のペグIFNとリバビリンの併用療法の治療成績を改善するようなC型慢性肝炎に特化した栄養補助剤の開発につながるものと思われる。

E. 結論

β-カロテン、ビタミンD2、リノール酸がHCV RNAの複製を抑制する栄養成分であることを明らかにした。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Dansako H, Ikeda M, Kato N. Limited suppression of the interferon-beta production by hepatitis C virus serine protease in cultured human hepatocytes. FEBS J. 274:4161-4176 (2007).
- 2) Ikeda M, Kato N. Life style-related diseases of the digestive system: cell culture system for the screening of anti-HCV reagents: suppression of HCV replication by statins and synergistic action with interferon. J Pharmacol Sci. 105:145-150 (2007).
- 3) Ikeda M, Kato N. Modulation of host metabolism as a target of new antivirals. Adv. Drug Deliv. Rev. 59:1277-1289 (2007).
- 4) Peng LF, Kim SS, Matchacheep S, Lei X, Su S, Lin W, Runguphan W, Choe WH, Sakamoto N, Ikeda M, Kato N, Beeler AB, Porco JA Jr, Schreiber SL, Chung RT: Identification of Novel Epoxide Inhibitors of HCV Replication Using a High-Throughput Screen. Antimicrob. Agents Chemother. 51(10): 3756-3759 (2007)
- 5) Ariumi Y, Kuroki M, Abe K, Dansako H, Ikeda M, Wakita T, Kato N. DDX3 DEAD box RNA helicase is required for hepatitis C virus (HCV) RNA replication. J. Virol. 81:13922-13926 (2007).
- 6) Yano M, Ikeda M, Abe K, H. Dansako H., Ohkoshi S, Aoyagi, Y, Kato N. Comprehensive Analysis of the Effects of Ordinary Nutrients on Hepatitis C Virus RNA Replication in Cell Culture. Antimicrob.

- Agents Chemother. 51:2016-2027 (2007).
- 7) Abe K, Ikeda M, Ariumi Y, Dansako H, Kato N. Serum-free cell culture system supplemented with lipid-rich albumin for hepatitis C virus (strain O of genotype 1b) replication. *Virus Res.* 125:162-168 (2007).
- 8) Abe K, Ikeda M, Dansako H, Naka K, Kato N. Cell culture-adaptive NS3 mutations required for the robust replication of genome-length hepatitis C virus RNA. *Virus Res.* 125: 88-97 (2007).
2. 学会発表
- 1) 池田 正徳, HCV RNA 複製細胞を用いた抗 HCV 剤の探索：スタチン剤とインターフェロン併用の有用性を中心として。第 80 回日本薬理学会年会、名古屋、2007 年 3 月。
- 2) 池田 正徳、矢野雅彦、阿部健一、有海康雄、團迫浩方、加藤宣之。C 型慢性肝炎に対する新しい治療剤候補の培養細胞アッセイ系を用いた探索・評価。第 72 回日本インターフェロン・サイトカイン学会学術集会、京都、2007 年 7 月。
- 3) 團迫 浩方、池田 正徳、加藤 宣之。Limited suppression of the interferon-production by hepatitis C virus serine protease in cultured human hepatocytes. 第 72 回日本インターフェロン・サイトカイン学会学術集会、京都、2007 年 7 月。
- 4) 池田 正徳、矢野 雅彦、阿部 健一、有海康雄、團迫 浩方、加藤 宣之。新しい C 型肝炎治療を目指した培養細胞系の開発。第 17 回 抗ウイルス化学療法研究会、高松、2007 年 5 月。
- 5) 矢野 雅彦、池田 正徳、阿部 健一、團迫浩方、大越 章吾、青柳 豊、加藤 宣之。抗 HCV 剤治療効果の増強が期待される物質の網羅的スクリーニング—C 型肝炎に対する治療効果の最大化を目指して—。第 43 回日本肝臓学会総会、東京、2007 年 5 月。
- 6) Kato N, Abe K, Mori K, Ariumi Y, Dansako H, Ikeda M. HCV genetic variability and dynamics in long-term culture of genom-length HCV RNA replicating cells. 第 66 回 日本癌学会学術総会、横浜、2007 年 10 月。
- 7) Ariumi Y, Kuroki M, Abe K, Dansako H, Ikeda M, Wakita T, Kato N. DDX3 DEAD box RNA helicase is required for hepatitis C virus RNA replication. 第 66 回日本癌学会学術総会、横浜、2007 年 10 月。
- 8) Ikeda M, Yano M, Abe K, Dansako H, Ohkoshi S, Aoyagi Y, Kato N. Comprehensive screening of ordinary nutrients expected to enhance the effects of anti-HCV reagents. 第 66 回日本癌学会学術総会、横浜、2007 年 10 月。
- 9) 森 京子、阿部 健一、團迫 浩方、有海康雄、池田 正徳、加藤 宣之。C 型急性肝炎患者血清由来の HCV1b レプリコン複製細胞株の樹立。第 23 回中国四国ウイルス研究会、松山、2007 年 6 月。
- 10) 阿部 健一、池田 正徳、有海康雄、團迫浩方、加藤 宣之。持続的な全長 HCV RNA 複製を維持できる無血清培地を用いた細胞培養

系の開発. 第 23 回中国四国ウイルス研究会、
松山、2007 年 6 月.

- 11) 矢野 雅彦、池田 正徳、阿部 健一、團迫 浩方、大越 章吾、青柳 豊、加藤 宣之. 全長 HCV RNA の複製に影響を与える日常的に摂取する栄養成分の同定および評価. 第 23 回中国四国ウイルス研究会、松山、2007 年 6 月.
- 12) Kato N, Abe K, Mori K, Ariumi Y, Dansako H, Ikeda M. HCV genetic variability and dynamics in long-term culture of genome-length HCV RNA-replicating cells. 14th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Glasgow, UK, September, 2007.
- 13) Abe K, Ikeda M, Ariumi Y, Dansako H, Kato N. Serum-free cell culture system supplemented with lipid-rich albumin for genome-length HCV RNA replication. 14th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Glasgow, UK, September, 2007.
- 14) Yano M, Ikeda M, Abe K, Dansako H, Ohkoshi S, Aoyagi Y, Kato N. Comprehensive analysis of the ordinary nutrients as the novel partners of anti-HCV reagents. 14th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Glasgow, UK, September, 2007.
- 15) Dansako H, Ikeda M, Abe K, Mori K, Ariumi Y, Kato N. A new antiviral assay system using the living cells harboring genome-length HCV RNA. 14th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Glasgow, UK, September, 2007.
- 16) Ariumi Y, Kuroki M, Abe K, Dansako H, Ikeda M, Wakita T, Trono D, Kato N. DNA damage sensors, ATM and Chk2, are required for hepatitis C virus RNA. 14th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Glasgow, UK, September, 2007.
- 17) 加藤 宣之、阿部 健一、森 京子、有海 康雄、團迫 浩方、池田 正徳. 全長 HCV RNA 複製細胞の長期培養により生じる HCV の遺伝的多様性. 第 55 回日本ウイルス学会学術集会、札幌、2007 年 10 月.
- 18) 團迫 浩方、池田 正徳、阿部 健一、森 京子、有海 康雄、加藤 宣之. 全長 HCV-RNA の複製 レベルを指標として生細胞のままアッセイできる新しい抗ウイルス剤評価システム. 第 5 回日本ウイルス学会学術集会、札幌、2007 年 10 月.
- 19) 森 京子、阿部 健一、團迫 浩方、有海 康雄、池田 正徳、加藤 宣之. C 型急性肝炎患者血清由来の 1b 型 HCV レプリコン複製細胞株の樹立. 第 55 回日本ウイルス学会学術集会、札幌、2007 年 10 月.
- 20) 矢野 雅彦、池田 正徳、阿部 健一、團迫 浩方、大越 章吾、青柳 豊、加藤 宣之. 日常的に摂取し抗 HCV 効果を有する栄養成分の全長 HCV RNA 複製細胞を用いた網羅的探索. 第 55 回日本ウイルス学会学術集会、札幌、2007 年 10 月.
- 21) 有海 康雄、黒木 美沙緒、阿部 健一、團迫 浩方、池田 正徳、脇田 隆宇、Didier Trono、加藤宣之. DNA 損傷センサー ATM と

Chk2 は HCV の RNA 複製に必要な宿主因子である。第 55 回日本ウイルス学会学術集会、札幌、2007 年 10 月。

- 22) 有海 康雄、黒木 美沙緒、阿部 健一、團迫 浩方、池田 正徳、脇田 隆字、加藤 宣之。HCV の RNA 複製に必要な宿主因子 DDX3 DEAD box RNA ヘリカーゼ。第 55 回日本ウイルス学会学術集会、札幌、2007 年 10 月。

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

分担研究報告書

ラミブジン耐性獲得に影響をおよぼす HBV 遺伝子変異の網羅的解析

分担研究者 大阪大学大学院医学系研究科 准教授 竹原 徹郎

研究要旨 B型肝炎に対する核酸アナログ製剤の投与は副作用が少なく、確実な抗ウイルス効果が期待できる優れた治療法である。しかしながら、HBV ポリメラーゼ遺伝子領域に特有な変異が入ることにより、耐性ウイルスが出現することが臨床上の大きな問題になっている。HBV ポリメラーゼ領域に出現する耐性変異はウイルスの増殖能を低下させることがあり、viral breakthrough をおこすためにはなんらかの補助的な変異が必要となる場合がある。ラミブジン耐性変異 M204V/I における L180M はそのような例のひとつで、L180M は M204V/I による増殖の低下を補完する作用があるとされている。しかしながら、M204V/I においても L180M を伴わないことがあり、このような場合に他の遺伝子領域の変異がラミブジン耐性出現に寄与している可能性があるが、詳細は不明である。本研究では、44 例のラミブジン耐性変異株の全遺伝子塩基配列解析を行い、pre Core ストップコドン変異と pre S2 欠失が L180M を有しない株で高頻度に出現することを見出した。変異 HBV 遺伝子を用いた *in vitro* での増殖系を用いて、これらの変異が M204V/I による増殖を L180M よりも強力に増強することが明らかとなった。HBV はポリメラーゼ遺伝子の RT ドメイン以外にもその増殖を修飾する領域があり、これらにおける変異の有無が薬剤耐性の出現になんらかの意義を有することが明らかとなった。

共同研究者

大川和良 大阪大学消化器内科学 助教

A. 研究目的

B型肝炎ウイルスに対する特異的抗ウイルス治療剤である核酸アナログ製剤の開発とその臨床導入は B型肝炎患者のウイルス増殖のコントロールと炎症の鎮静化を容易にし、画期的な進歩をもたらした。このような背景から、本邦では現在ラミブジン、アデフォビル、エンテカビルの3剤が使用可能となっている。しかしながら、核酸アナロ

グ製剤には薬剤中止によりウイルス増殖および炎症の再燃をきたすこと、また、長期使用により耐性ウイルスが出現することなどが問題となっている。核酸アナログ製剤の薬剤耐性の獲得は HBV ポリメラーゼ遺伝子の RT ドメインの特有の遺伝子変異によりもたらされることが明らかになっている。しかしながら、一般にこのような変異は本来のウイルス増殖にとって負に作用することが予想され、実際に M204 におけるラミブジン耐性変異の獲得のためには増殖を維持するための L180M を伴うことが多いことが知られている。しかし、すべての

M204V/I 変異株が L180M を伴うわけではなく、L180M 以外のウイルス遺伝子変異が M204V/I の出現に関与している可能性がある。

そこで本研究ではラミブジン投与中に viral breakthrough をきたした症例の HBV の全遺伝子配列を解析することにより L180M の出現の有無と関連する遺伝子変異を抽出し、その機能的意義を培養細胞における HBV 増殖で検討した。

B. 研究方法

大阪大学およびその関連施設においてラミブジン投与中に耐性変異が出現した 44 例の耐性出現後の血清を解析対象とした。血清より DNA を抽出し全遺伝子塩基配列を直接法で解析した。L180M 変異を有する群と有しない群にわけ臨床背景と他の遺伝子領域の変異の有無について検討を行った。野生型 HBV DNA を 1.2-mer タンデムにつないだ発現プラスミドをバックボーンとして種々の点変異を挿入したプラスミドを作成した。これらを Huh7 細胞にトランスフェクションし、ウイルス増殖をサザンプロットにて検討した。

C. 研究結果

44 例から抽出された HBV 株を分子系統樹解析を行ったところ、全株が Genotype C2 に分類された。L180M 変異を有するものが 30 例、L180M を有しないものが 14 例であった。臨床的背景については両群間で有意な差は認めなかった。両群において HBV DNA の全遺伝子配列の比較を行ったところ、L180M を有しない株は全例 M204I 変異を有しており、M204V 変異を有する例はみられなかった。一方、L180M 変異を有する株は M204V を有するものが 53%、M204I を有するものが 47%であった。その他の領域

では L180M 変異を有しない群で有する群に比し、A1896 の pre Core ストップコドン変位、pre S2 領域にフレームシフトを伴わない欠失を有する頻度が有意に高かった。

Pre Core ストップコドン変異と pre S2 欠失についてラミブジン投与前と投与後の比較を一部の症例で行ったところ、治療後に pre Core ストップコドン変異を認めた例は 11 例中 8 例で治療前より同変異が認められ、治療中に出現した例は 3 例であった。一方、pre S2 の欠失を治療後に認めた例で治療前から同欠失を有すものは 5 例中 1 例であり、4 例は治療中に出現していた。

Genotype C の発現プラスミドをバックボーンとして pre Core 変異、pre S2 欠失をもつプラスミドを作成し、さらにこれらのプラスミドに M204V/I 変異および L180M 変異を挿入した。これらのプラスミドを Huh7 細胞に導入し、ウイルス増殖をサザン法で検討したところ、pre Core 変異、pre S2 欠失を有するウイルスは野生型に比し、全般的に高いウイルス増殖がみられた。また、M204V/I 変異を挿入するとすべての型で増殖が低下した。L180M 変異を導入することにより、M204I による増殖低下はやや改善した。しかし、pre Core あるいは pre S2 変異は L180M 変異より強力にウイルス増殖を増強した。

D. 考察と結論

今回の 44 例のラミブジン耐性株の解析では、M204V 変異を有する株は全例 L180M 変異を有していたが、M204I 株では L180M を有するものとそうでないものが混在していた。M204V の成立には L180M 変異が必要であり、M204I については L180M が必ずしも必要でないということであり、既報と一致す

る結果であった。L180Mを有しない株は、有する株に比し、新たに pre Core ストップコドン変異あるいは pre S2 欠失が多いことが判明した。これらの変異は in vitro の解析により、野生株に比しウイルス増殖能が高く、M204V/I 変異により増殖が低下した株でも増殖能が高く維持されていた。今回新たに同定したこれらの変異は L180M 変異とは別の M204V/I 変異をサポートする変異であり、これらの存在がラミブジン耐性の出現に関与していることが示された。

B 型肝炎ウイルスの核酸アナログ耐性の獲得にはポリメラーゼ遺伝子の RT ドメインの変異とともに、それ以外の領域の変異が補助的に影響している可能性がある。このような変異の検討を行うことは、核酸アナログ耐性を起こしやすい株を同定する上で重要であると考えられる。

E. 研究発表

論文発表

1. Kanada A, Takehara T, Ohkawa K, Tatsumi T, Sakamori R, Yamaguchi S, Uemura A, Kohga K, Sasakawa A, Hikita H, Hijioka T, Katayama K, Deguchi M, Kagita M, Kanto T, Hiramatsu N, Hayashi N. Type B Fulminant Hepatitis Is Closely Associated with a Highly Mutated Hepatitis B Virus Strain. *Intervirology* 50:349-401, 2007.
2. Kurashige N, Hiramatsu N, Ohkawa K, Oze T, Inoue Y, Kurokawa M, Yakushijin T, Igura T, Kiso S, Kanto T, Takehara T, Tamura S, Kasahara A, Oshita M, Hijioka T, Katayama K, Yoshihara H, Hayashi E, Imai Y, Kato M, Hayashi N. Initial viral response is the

most powerful predictor of the emergence of YMDD mutant virus in chronic hepatitis B patients treated with lamivudine. *Hepatol Res* (in press).

F. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

分担研究報告書

栄養成分の HCV に及ぼす効果の検討

分担研究者 岡山大学 准教授 池田 正徳

研究要旨 全長 HCV RNA (1b 型 HCV-0 株) の複製レベルを迅速かつ正確に定量できる OR6 細胞レポーターアッセイ系を用いて、日常的に摂取する栄養成分の HCV RNA 複製に及ぼす効果を検討し、以下のような結果を得た。(1) 検討した 46 種類の栄養成分のうち細胞増殖に影響を与えない濃度で、 β -カロテン、ビタミン D2、リノール酸の 3 成分が濃度依存的に HCV RNA の複製を抑制することを明らかにした。(2) ビタミン A、C、K、E は HCV RNA の複製を増強してしまうことを示した。(3) 抗 HCV 効果を示した 3 成分とインターフェロンあるいはフルバスタチンとの併用では相加効果を、サイクロスポリン A との併用では相乗効果を示すことを示した。以上の結果、日常的に摂取する栄養成分には C 型慢性肝炎の治療を補助する可能性があることを示した。

A. 研究目的

C 型肝炎ウイルス (HCV) 感染は高率に慢性肝炎となり、致命的な肝硬変、肝癌へと進行する。肝硬変、肝癌に対する決定的な治療法がない現状では、C 型慢性肝炎患者からウイルスを排除することがこの連鎖を断ち切る最善の治療戦略と思われる。インターフェロン (IFN) 療法は改善され、現在ペグ IFN とリバビリンの併用が標準的な治療法となっているがその治癒率は約 50%にとどまっている。

昨今ではサプリメントの効能に関する情報が氾濫しているが、その多くが過剰な期待を抱かせるものであり、また、科学的な検証を経ていない。日常的に摂取している栄養成分が C 型肝炎ウイルスに及ぼす影響についてはこれまで、十分な検討がなされていない。HCV RNA の複製を抑制するような栄養成分が同定できれば、IFN 療法の効果を補助

することが可能となる。また、HCV RNA の複製を増強する栄養成分の過剰な摂取は IFN 療法の効果を気付かぬうちに減弱させてしまうかもしれない。

本研究では、レポーターを含む全長 HCV RNA 複製細胞 (OR6 アッセイシステム) を用いて日常的に摂取する栄養成分の HCV RNA の複製に及ぼす効果を明らかにする目的で以下のような実験を行った。

B. 研究方法

HCV-0 株 (遺伝子型 1b) 由来の全長 HCV RNA 複製細胞 (OR6 細胞) を用いて栄養成分の HCV RNA 複製に及ぼす効果を検討した。OR6 細胞はレニラルシフェラーゼ遺伝子、ネオマイシン耐性遺伝子を含む全長 HCV RNA をヒト肝癌細胞株である HuH-7 細胞に導入後、薬剤選択により得られたクローン化細胞株である。OR6 細胞ではレニラルシフェラーゼ活性を測定することで HCV RNA の複製レベルを

評価することが可能である (OR6 アッセイシステム)。

本研究では18種類のビタミン類、6種類のアミノ酸、11種類の脂肪酸、11種類の無機塩類について HCV RNA 複製に及ぼす効果を OR6 アッセイシステムで評価した。ビタミン類として、β-カロテン、ビタミン A、B1、B2、B3、B6、B12、C、E、K1、K2、K3、ビオチン、パントテン酸、イノシトール、葉酸を用いた。アミノ酸として、トリプトファン、ロイシン、イソロイシン、バリン、チロシン、フェニールアラニンを用いた。脂肪酸として、リノール酸、アラキドン酸、エイコサペンタエン酸、ドコサヘキサエン酸、ラウリン酸、パルミチン酸、ステアリン酸、ペヘン酸、オレイン酸、エライジン酸、バクセン酸を用いた。無機塩類としては、Fe (II) SO₄、Fe (III) (NO₃)₂、ZnCl₂、Na₂SeO₄、NaCl、KCl、CaCl₂、PCl₃、MgCl₂、CuCl₂、MnCl₂、を用いた。

各栄養成分を OR6 細胞に添加する 24 時間前に、OR6 細胞を 1 ウェルあたり 2x10⁴ ずつ 24 ウェルプレートに蒔きこんだ。濃度を変えて各栄養成分を細胞に添加して 72 時間培養を行った。細胞を回収し、レニラルシフェラーゼ活性を測定した。

各栄養成分が細胞増殖に影響を与えない濃度については栄養成分を OR6 細胞に添加後 72 時間培養し、トリパンブルー染色で生細胞を数えて栄養成分を添加していないコントロール細胞と比較し決定した。

HCV RNA 複製に対して抑制効果のある栄養成分に関しては、これまでに抗 HCV 効果の報告されている、IFN-α、フルバスタチン、サイクロスポリン A との併用効果について検討した。

OR6 細胞で複製する HCV RNA には外来性の遺伝子

であるレニラルシフェラーゼ遺伝子、ネオマイシン耐性遺伝子、脳心筋炎ウイルスの internal ribosomal entry site の遺伝子が含まれている。栄養成分がこれらの外来性遺伝子に影響を与える可能性を否定するため、本来の全長 HCV RNA (HCV-0 株) を導入した HCV RNA 複製細胞を用いて、栄養成分の効果を検討した。

(倫理面への配慮)

本研究で実験に用いられた材料は全てこれまでに確立されているものであり、新たに用いた臨床材料はない。そのため、倫理面への特段の配慮はなかった。

C. 研究結果

46 種類の栄養成分について HCV RNA の複製に及ぼす効果を検討した。HCV RNA 複製に対して抑制効果を示したのは、β-カロテン、ビタミン D₂、リノール酸、アラキドン酸、エイコサペンタエン酸、ドコサヘキサエン酸、Fe (II) SO₄、Fe (III) (NO₃)₂、ZnCl₂ の 9 種類であった。一方、HCV RNA 複製に対して増強効果があったのは、ビタミン A、C、E、K1、K2、K3、トリプトファン、Na₂SeO₄ の 8 種類であった。残りの 29 種類の栄養成分は HCV RNA 複製に対して影響を与えなかった。これらの結果は、日常的に摂取している栄養成分のほとんどは HCV RNA 複製に影響を及ぼさないが、一部の栄養成分は HCV RNA 複製に対して抑制あるいは増強効果を有することを示している。

HCV RNA 複製に対して細胞増殖に及ぼす効果を検討した。リノール酸、アラキドン酸、エイコサペンタエン酸、ドコサヘキサエン酸などの多価不飽和脂肪酸についてはこれまでに抗 HCV 効果が報

告されている。しかし、今回、OR6 細胞で抗 HCV 効果を示した多価不飽和脂肪酸のうちリノール酸以外の多価不飽和脂肪酸では50 μ M 以上の濃度で細胞増殖の抑制を認めた。抗 HCV 効果を示した3種類の無機塩類では、50%抑制効果を示す濃度までは細胞増殖に影響を認めなかった。しかし、50%抑制効果を示す濃度よりも高い濃度では細胞増殖の抑制を認めた。これらの結果を踏まえて、以後の解析には β -カロテン、ビタミン D2、リノール酸の3成分を用いて行った。

β -カロテン、ビタミン D2、リノール酸の EC50 はそれぞれ、6.3 μ M、3.8 μ M、20.2 μ M であった。

HCV RNA 複製に抑制あるいは、増強効果を示した、栄養成分については、外来性遺伝子を含まない本来の全長 HCV RNA が複製する細胞を用いて HCV の Core 蛋白質の発現に対してウエスタンブロット解析を行ったが、濃度依存的な抑制効果あるいは、増強効果を確認した。このことは、HCV RNA 複製に影響を及ぼした栄養成分の効果が外来性の遺伝子あるいは遺伝子産物ではなく HCV RNA 複製を抑制していることを示している。

β -カロテン、ビタミン D2、リノール酸をこれまでに抗 HCV 効果の報告がされている IFN- α 、フルバスタチン、サイクロスポリン A と併用した時の効果について検討した。2種類の物質を濃度を変えて同時に OR6 細胞に添加したときの EC50 をプロットして得られた Isobole plot により相反、相加、相乗効果を判定した。IFN- α に各栄養成分を併用した時相加効果が認められた。フルバスタチンに各栄養成分を併用した時にも相加効果が認められた。一方、サイクロスポリン A に各栄養成分を併用した時には、相乗効果が認められた。これらの結果は β -カロテン、ビタミン D2、リノール酸は、

既存の抗 HCV 効果の認められている薬剤の効果を補助し増強させる可能性を示唆している。

栄養成分には β -カロテン、ビタミン D2、リノール酸のように抗 HCV 効果を示すものがあるが、一方では、ビタミン A、C、K、E のように HCV RNA の複製を増強してしまうものも存在する。HCV RNA の複製を増強する栄養成分のうちビタミン E を用いて、 β -カロテン、ビタミン D2、リノール酸の抗 HCV 効果に及ぼす効果について検討した。ビタミン E は β -カロテン、ビタミン D2、リノール酸の抗 HCV 効果を減弱させてしまうことが分かった。抗 HCV 効果の知られている IFN- α 、IFN- β 、フルバスタチン、サイクロスポリン A の抗 HCV 効果にたいするビタミン E の効果についても検討した。サイクロスポリン A の抗 HCV 効果はビタミン E により減弱した。一方、IFN- α 、IFN- β 、フルバスタチンの抗 HCV 効果はビタミン E の影響を受けなかった。以上の結果はビタミン E の代わりにセレンウムを用いた実験でも同様であった。これらのことは、 β -カロテン、ビタミン D2、リノール酸、サイクロスポリン A の抗 HCV 効果には酸化ストレスの関与が示唆された。

D. 考察

これまでに、日常的に摂取する栄養成分の HCV RNA 複製に及ぼす効果の検討は多価不飽和脂肪酸、鉄などに限られており網羅的な検討はなされていない。本研究では、ビタミン、アミノ酸、脂肪酸、無機塩類からなる46種類の栄養成分の HCV RNA 複製に及ぼす効果についてレポータ遺伝子を含む全長 HCV RNA 複製細胞 (OR6 細胞) を用いて検討した。ほとんどの栄養成分は HCV RNA 複製に影響を与えなかったが、細胞増殖に影響を与えない濃度

でβ-カロテン、ビタミン D2、リノール酸は HCV RNA 複製を抑制することがわかった。一方、ビタミン A、C、K、E、トリプトファン、セレンウムは HCV RNA 複製を増強することがわかった。通常の食事では HCV RNA 複製を抑制するものと促進するものが混在しており、HCV RNA 複製に及ぼす効果は相殺されてしまっているものと思われる。HCV RNA 複製を抑制するβ-カロテン、ビタミン D2、リノール酸だけでは強力な抗 HCV 効果は期待できないが、IFN-α の効果を増強することより、IFN 治療の補助剤としての役割が期待できるものと思われる。

昨今のサプリメントブームで抗酸化物質は酸化ストレスから細胞を守る機能から過剰に摂取されていることも多い。しかしながら、ビタミン C、E やセレンウムなどの抗酸化剤として知られるものは本研究で明らかのように HCV RNA 複製を増強してしまい HCV の治療の観点からはむしろマイナスの効果をもたらす可能性があるために注意しなければならない。

本研究はいままであまり注目されていなかった栄養学的側面から HCV RNA 複製について解析したもので、現在のpeg IFN とリバビリンの併用療法の治療成績を改善するような C 型慢性肝炎に特化した栄養補助剤の開発につながるものと思われる。

E. 結論

β-カロテン、ビタミン D2、リノール酸が HCV RNA の複製を抑制する栄養成分であることを明らかにした。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Dansako H, Ikeda M, Kato N. Limited suppression of the interferon-beta production by hepatitis C virus serine protease in cultured human hepatocytes. FEBS J. 274:4161-4176 (2007).
- 2) Ikeda M, Kato N. Life style-related diseases of the digestive system: cell culture system for the screening of anti-HCV reagents: suppression of HCV replication by statins and synergistic action with interferon. J Pharmacol Sci. 105:145-150 (2007).
- 3) Ikeda M, Kato N. Modulation of host metabolism as a target of new antivirals. Adv. Drug Deliv. Rev. 59:1277-1289 (2007).
- 4) Peng LF, Kim SS, Matchacheep S, Lei X, Su S, Lin W, Runguphan W, Choe WH, Sakamoto N, Ikeda M, Kato N, Beeler AB, Porco JA Jr, Schreiber SL, Chung RT: Identification of Novel Epoxide Inhibitors of HCV Replication Using a High-Throughput Screen. Antimicrob. Agents Chemother. 51(10): 3756-3759 (2007)
- 5) Ariumi Y, Kuroki M, Abe K, Dansako H, Ikeda M, Wakita T, Kato N. DDX3 DEAD box RNA helicase is required for hepatitis C virus (HCV) RNA replication. J. Virol. 81:13922-13926 (2007).
- 6) Yano M, Ikeda M, Abe K, H. Dansako H., Ohkoshi S, Aoyagi, Y, Kato N. Comprehensive Analysis of the Effects of Ordinary

Nutrients on Hepatitis C Virus RNA Replication in Cell Culture. *Antimicrob. Agents Chemother.* 51:2016-2027 (2007).

- 7) Abe K, Ikeda M, Ariumi Y, Dansako H, Kato N. Serum-free cell culture system supplemented with lipid-rich albumin for hepatitis C virus (strain O of genotype 1b) replication. *Virus Res.* 125:162-168 (2007).
- 8) Abe K, Ikeda M, Dansako H, Naka K, Kato N. Cell culture-adaptive NS3 mutations required for the robust replication of genome-length hepatitis C virus RNA. *Virus Res.* 125: 88-97 (2007).

2. 学会発表

- 1) 池田 正徳. HCV RNA 複製細胞を用いた抗 HCV 剤の探索：スタチン剤とインターフェロン併用の有用性を中心として. 第 80 回日本薬理学会年会, 名古屋, 2007 年 3 月.
- 2) 池田 正徳、矢野雅彦、阿部健一、有海康雄、團迫浩方、加藤宣之. C 型慢性肝炎に対する新しい治療剤候補の培養細胞アッセイ系を用いた探索・評価. 第 72 回日本インターフェロン・サイトカイン学会学術集会、京都、2007 年 7 月.
- 3) 團迫 浩方、池田 正徳、加藤 宣之. Limited suppression of the interferon-production by hepatitis C virus serine protease in cultured human hepatocytes. 第 72 回日本インターフェロン・サイトカイン学会学術集会、京都、2007 年 7 月.
- 4) 池田 正徳、矢野 雅彦、阿部 健一、有海
- 5) 康雄、團迫 浩方、加藤 宣之. 新しい C 型肝炎治療を目指した培養細胞系の開発. 第 17 回 抗ウイルス化学療法研究会、高松、2007 年 5 月.
- 5) 矢野 雅彦、池田 正徳、阿部 健一、團迫浩方、大越 章吾、青柳 豊、加藤 宣之. 抗 HCV 剤治療効果の増強が期待される物質の網羅的スクリーニング—C 型肝炎に対する治療効果の最大化を目指して—. 第 43 回日本肝臓学会総会、東京、2007 年 5 月.
- 6) Kato N, Abe K, Mori K, Ariumi Y, Dansako H, Ikeda M. HCV genetic variability and dynamics in long-term culture of genom-length HCV RNA replicating cells. 第 66 回 日本癌学会学術総会、横浜、2007 年 10 月.
- 7) Ariumi Y, Kuroki M, Abe K, Dansako H, Ikeda M, Wakita T, Kato N. DDX3 DEAD box RNA helicase is required for hepatitis C virus RNA replication. 第 66 回日本癌学会学術総会、横浜、2007 年 10 月.
- 8) Ikeda M, Yano M, Abe K, Dansako H, Ohkoshi S, Aoyagi Y, Kato N. Comprehensive screening of ordinary nutrients expected to enhance the effects of anti-HCV reagents. 第 66 回日本癌学会学術総会、横浜、2007 年 10 月.
- 9) 森 京子、阿部 健一、團迫 浩方、有海 康雄、池田 正徳、加藤 宣之. C 型急性肝炎患者血清由来の HCV1b レプリコン複製細胞株の樹立. 第 23 回中国四国ウイルス研究会、松山、2007 年 6 月.
- 10) 阿部 健一、池田 正徳、有海 康雄、團迫

- 浩方、加藤 宣之. 持続的な全長 HCV RNA 複製を維持できる無血清培地を用いた細胞培養系の開発. 第 23 回中国四国ウイルス研究会、松山、2007 年 6 月.
- 11) 矢野 雅彦、池田 正徳、阿部 健一、團迫 浩方、大越 章吾、青柳 豊、加藤 宣之. 全長 HCV RNA の複製に影響を与える日常的に摂取する栄養成分の同定および評価. 第 23 回中国四国ウイルス研究会、松山、2007 年 6 月.
 - 12) Kato N, Abe K, Mori K, Ariumi Y, Dansako H, Ikeda M. HCV genetic variability and dynamics in long-term culture of genome-length HCV RNA-replicating cells. 14th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Glasgow, UK, September, 2007.
 - 13) Abe K, Ikeda M, Ariumi Y, Dansako H, Kato N. Serum-free cell culture system supplemented with lipid-rich albumin for genome-length HCV RNA replication. 14th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Glasgow, UK, September, 2007.
 - 14) Yano M, Ikeda M, Abe K, Dansako H, Ohkoshi S, Aoyagi Y, Kato N. Comprehensive analysis of the ordinary nutrients as the novel partners of anti-HCV reagents. 14th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Glasgow, UK, September, 2007.
 - 15) Dansako H, Ikeda M, Abe K, Mori K, Ariumi Y, Kato N. A new antiviral assay system using the living cells harboring genome-length HCV RNA. 14th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Glasgow, UK, September, 2007.
 - 16) Ariumi Y, Kuroki M, Abe K, Dansako H, Ikeda M, Wakita T, Trono D, Kato N. DNA damage sensors, ATM and Chk2, are required for hepatitis C virus RNA. 14th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Glasgow, UK, September, 2007.
 - 17) 加藤 宣之、阿部 健一、森 京子、有海 康雄、團迫 浩方、池田 正徳. 全長 HCV RNA 複製細胞の長期培養により生じる HCV の遺伝的多様性. 第 55 回日本ウイルス学会学術集会、札幌、2007 年 10 月.
 - 18) 團迫 浩方、池田 正徳、阿部 健一、森 京子、有海 康雄、加藤 宣之. 全長 HCV-RNA の複製 レベルを指標として生細胞のままアッセイできる新しい抗ウイルス剤評価システム. 第 5 回日本ウイルス学会学術集会、札幌、2007 年 10 月.
 - 19) 森 京子、阿部 健一、團迫 浩方、有海 康雄、池田 正徳、加藤 宣之. C 型急性肝炎患者血清由来の 1b 型 HCV レプリコン複製細胞株の樹立. 第 5 回日本ウイルス学会学術集会、札幌、2007 年 10 月.
 - 20) 矢野 雅彦、池田 正徳、阿部 健一、團迫 浩方、大越 章吾、青柳 豊、加藤 宣之. 日常的に摂取し抗 HCV 効果を有する栄養成分の全長 HCV RNA 複製細胞を用いた網羅的探索. 第 55 回日本ウイルス学会学術集会、札幌、2007 年 10 月.
 - 21) 有海 康雄、黒木 美沙緒、阿部 健一、團

迫 浩方、池田 正徳、脇田 隆宇、Didier Trono、加藤宣之。DNA 損傷センサー ATM と Chk2 は HCV の RNA 複製に必要な宿主因子である。第 55 回日本ウイルス学会学術集会、札幌、2007 年 10 月。

22) 有海 康雄、黒木 美沙緒、阿部 健一、團迫 浩方、池田 正徳、脇田 隆宇、加藤宣之。HCV の RNA 複製に必要な宿主因子 DDX3 DEAD box RNA ヘリカーゼ。第 55 回日本ウイルス学会学術集会、札幌、2007 年 10 月。

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし