

○主任研究者(脇田 隆宇)の研究歴等

・過去に所属した研究機関の履歴

昭和63年～平成4年 名古屋大学大学院医学研究科
 平成4年～7年 ハーバード大学医学部およびマサチューセッツ総合病院癌センター・客員研究員
 平成7年～10年 東京都臨床医学総合研究所・主任研究員
 平成10年～18年 東京都神経科学総合研究所・副参事研究員
 平成18年～現在 国立感染症研究所・ウイルス第二部・部長

・主な指導を受けた研究者

名古屋大学大学院医学研究科：坂本信夫教授および各務伸一講師（前愛知医大消化器内科教授）
 米国ハーバード大学医学部およびマサチューセッツ総合病院癌センター：Jack Wands 准教授
 東京都臨床医学総合研究所：小原道法室長

・主な研究課題

C型肝炎ウイルス感染複製機構の解析
 肝炎ウイルスの病原性発現機構の解析
 肝炎ウイルス感染症の新たな治療法の開発
 下痢症ウイルスおよびエンテロウイルスのウイルス学

・これまでの研究実績

Hara H, Aizaki H, Matsuda M, Shinkai-Ouchi F, Inoue Y, Murakami K, Shoji I, Kawakami H, Matsuura Y, Lai MM, Miyamura T, Wakita T, Suzuki T. Involvement of creatine kinase B in hepatitis C virus genome replication through interaction with the viral NS4A protein. *J Virol*. 2009 83(10):5137-47.

Akazawa D, Date T, Morikawa K, Murayama A, Omi N, Takahashi H, Nakamura N, Ishii K, Suzuki T, Mizokami M, Mochizuki H, Wakita T. Characterization of infectious hepatitis C virus from liver-derived cell lines. *BBRC*. 2008 377(3):747-51.

Masaki T, Suzuki R, Murakami K, Aizaki H, Ishii K, Murayama A, Date T, Matsuura Y, Miyamura T, Wakita T, Suzuki T. Interaction of hepatitis C virus nonstructural protein 5A with core protein is critical for the production of infectious virus particles. *J Virol*. 2008 82:7964-76.

Aizaki H, Morikawa K, Fukasawa M, Hara H, Inoue Y, Tani H, Saito K, Nishijima M, Hanada K, Matsuura Y, Lai MM, Miyamura T, Wakita T, Suzuki T. Critical role of virion-associated cholesterol and sphingolipid in hepatitis C virus infection. *J Virol*. 2008 82:5715-24.

Miyazari Y, Atsuzawa K, Usuda N, Watashi K, Hishiki T, Zayas M, Bartschlag R, Wakita T, Hijikata M, Shimotohno K. The lipid droplet is an important organelle for hepatitis C virus production. *Nature Cell Biology* 2007 9(9):1089-97.

Murayama A, Date T, Morikawa K, Akazawa D, Miyamoto M, Kaga M, Ishii K, Suzuki T, Kato T, Mizokami M, Wakita T. The NS3 helicase and NS5B-to-3'X regions are important for efficient hepatitis C virus strain JFH-1 replication in Huh7 cells. *J Virol* 2007 81(15):8030-40.

Kato T, Date T, Murayama A, Morikawa K, Akazawa D, Wakita T. Cell culture and infection system for hepatitis C virus. *Nature Protocols*. 2006;1(5):2334-9.

Akazawa D, Date T, Morikawa K, Murayama A, Miyamoto M, Kaga M, Barth H, Baumert TF, Dubuisson J, Wakita T. CD81 expression is important for the permissiveness of Huh7 cell clones for heterogeneous hepatitis C virus infection. *J Virol* 2007 81(10):5036-45.

Kato T, Matsumura T, Heller T, Saito S, Sapp RK, Murthy K, Wakita T, Liang TJ. Production of infectious hepatitis C virus of various genotypes in cell cultures. *J Virol* 2007 81(9):4405-11.

E Blanchard, S Belouzard, L Goueslain, T Wakita, J Dubuisson, C Wychowski, Y Rouill. Hepatitis C virus entry depends on Clathrin-Mediated Endocytosis. *Journal of Virology*, 2006. 80(14):6964-72.

T Kanda, A Basu, R Steele, T Wakita, JS. Ryerse, R Ray, RB Ray. Generation of infectious hepatitis C virus in immortalized human hepatocytes. *Journal of Virology*, 2006. 80(9):4633-9.

N Ishii, K Watashi, T Hishiki, K Goto, D Inoue, M Hijikata, T Wakita, N Kato, K Shimotohno. Characterization of the replication sensitivity to cyclosporin A among strains of hepatitis C virus *Journal of Virology*, 2006. 80(9):4510-20.

Yi M, Villanueva RA, Thomas DL, Wakita T, Lemon SM. Production of infectious genotype 1a hepatitis C virus (Hutchinsonstrain) in cultured human hepatoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 103(7):2310-5, 2006.

J Zhong, P Gastaminza, G Cheng, S Kapadia, T Kato, DR Burton, SF Wieland, S Uprichard, T Wakita, FV Chisari. Robust Hepatitis C Virus Infection in Vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005, 102:9294-9299.

T Wakita, T Pietschmann, T Kato, T Date, M Miyamoto, Z Zhao, K Murthy, A Habermann, H-G Krasslich, M Mizokami, et al. Production of Infectious Hepatitis C Virus in Tissue Culture from a Cloned Viral Genome. *Nature Medicine*. 2005 11:791-796.

T Kato, T Date, M Miyamoto, Z Zhao, M Mizokami, T Wakita. Non-Hepatic Cell Lines HeLa and 293 Cells Support Efficient Replication of Hepatitis C Virus Genotype 2a Subgenomic Replicon. *Journal of Virology* 2005 79:592-596.

Kato T and Wakita T. Development of an Infectious HCV Cell Culture System. In: *Hepatitis C Viruses Genomes and Molecular Biology* (ed. by Tan, S-L.) Horizon Bioscience, 2006, pp451-464.

<特許>

特願 2000-367365 劇症C型肝炎ウイルス株の遺伝子
 特願 2003-148242 遺伝子型 2a のC型肝炎ウイルス (HCV) ゲノム由来の核酸を含む核酸構築物、及び該核酸構築物を導入した細胞
 特願 2004-045489 ヒトC型肝炎ウイルスの全長ゲノムを含む核酸構築物及び該核酸構築物を導入した組換え全長ウイルスゲノム複製細胞、並びにヒトC型肝炎ウイルス粒子の作成方法
 特願 2004-243975 自律複製能を有する改変されたヒトC型肝炎ウイルスゲノムRNA

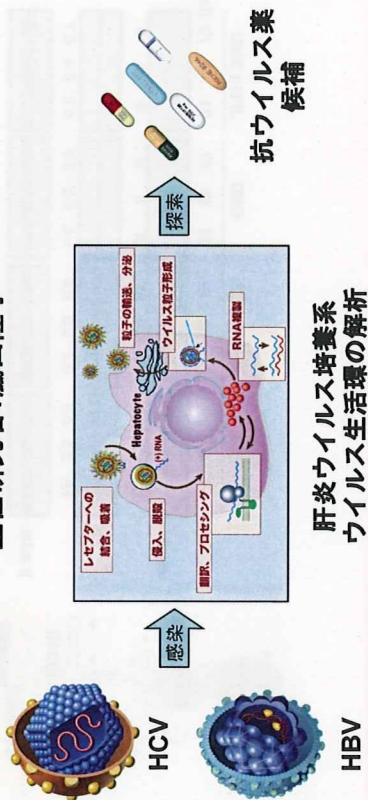
・平成22年度 肝炎等克服緊急対策研究事業への新規研究課題の応募状況

研究代表者、新規課題「肝炎ウイルス感染複製増殖過程の解明と新規治療法開発に関する研究」

肝炎ウイルスの培養系を用いた新規肝炎治療法の開発

(H19-肝炎一般-004)

主任研究者: 脇田隆宇



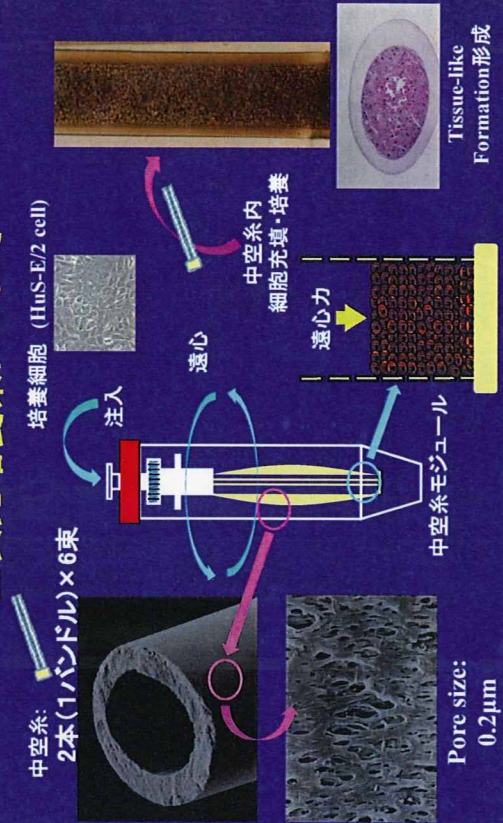
目的

- ・ HCVおよびHBVのウイルスキャリアが合計200万人以上存在する
- ・ 両ウイルスに対する抗ウイルス療法は充分ではなく、新たな治療法の開発が望まれる
- ・ 研究代表者はHCV培養系を開発した。また、HBVは複製増殖実験は可能だが、培養細胞による感染実験系は確立されていない
- ・ そこで、ウイルス培養系の開発・解析・改良と、ウイルス培養系を用いた新規肝炎治療法の開発を目的とする

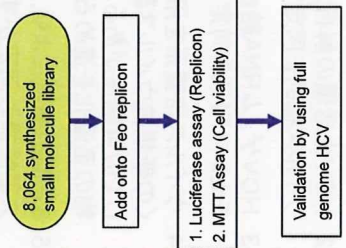
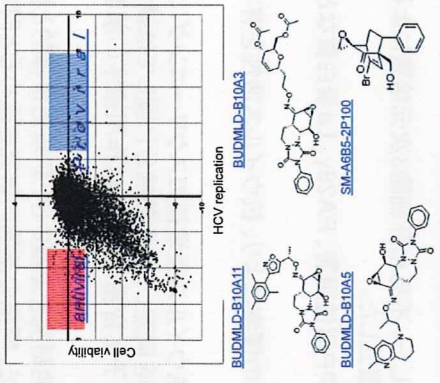
研究課題と分担研究者

1. 肝炎ウイルスの新規感染モデルの開発
(京大ウイルス研・土方、感染研・脇田、名市大・田中)
2. HCV増殖機構の解析と新規治療法の開発
(阪大微研・森石、金沢大・本多、学芸大・原田)
3. HCV生活環に関する宿主因子探索と新規治療法開発
(感染研・脇田、東医歯大・坂本、感染研・加藤)
4. HBV増殖機構の解析と新規治療法の開発
(名市大・田中、阪大・竹原、浜医大・上田)
5. 肝炎ウイルス培養系を用いた抗ウイルス薬スクリーニング
(感染研・武部、岡大・池田、東医歯大・坂本、感染研・脇田)

三次元培養系について

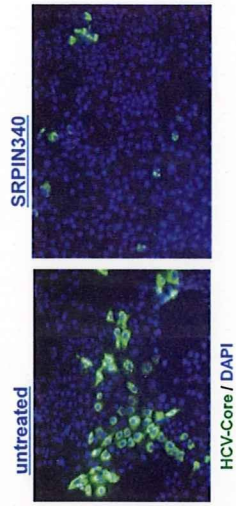
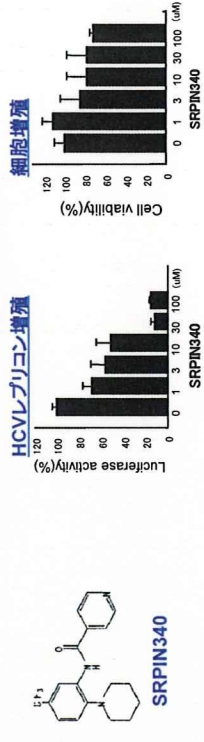


多様性指向性合成化合物(DOS)ライブラリー・スクリーニング



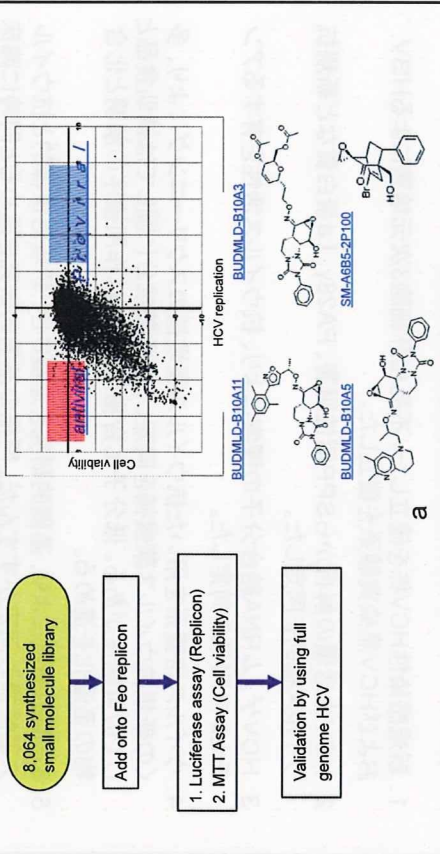
多様性指向性化合物ライブラリー-8,064化合物のスクリーニングにより
HCV増殖を特異的に抑制する4種のエポキシ化合物を同定した

SR protein-specific kinase (SRPK)阻害薬による HCV replicon増殖抑制効果



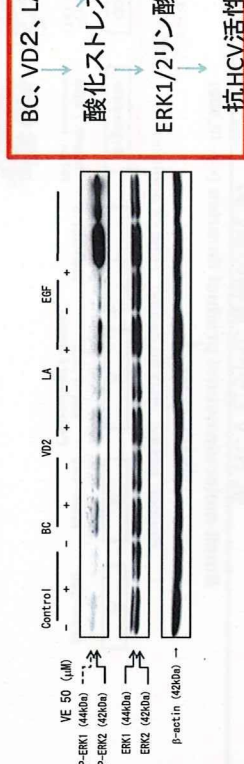
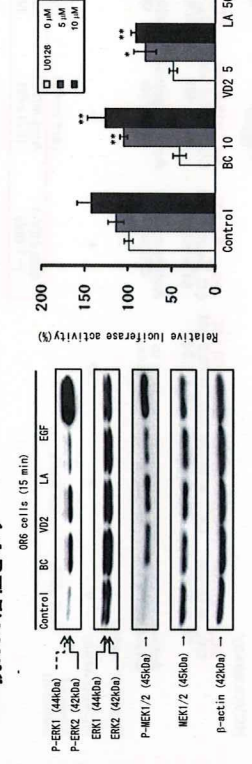
- SRPK阻害薬はHCV増殖を特異的に抑制した。
- SRPK1, SRPK2の強制発現・knock downによりHCVの発現が亢進・抑制されたことにより、HCV感染に宿主のSRPKが関与していることが示された。

抗HCV成分・薬物の抑制効果に対する抗酸化成分ビタミンE添加の影響

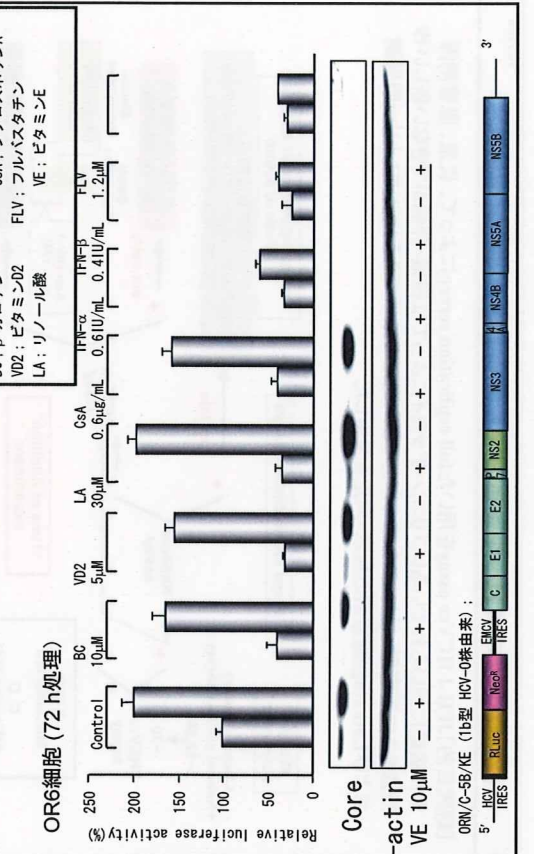


OR6細胞 (72 h処理)
Core
β-actin

BC, VD2, LAは酸化ストレスにより誘導されるERK1/2のリン酸化を介して 抗HCV活性を示す



多様性指向性合成化合物(DOS)ライブラリー・スクリーニング

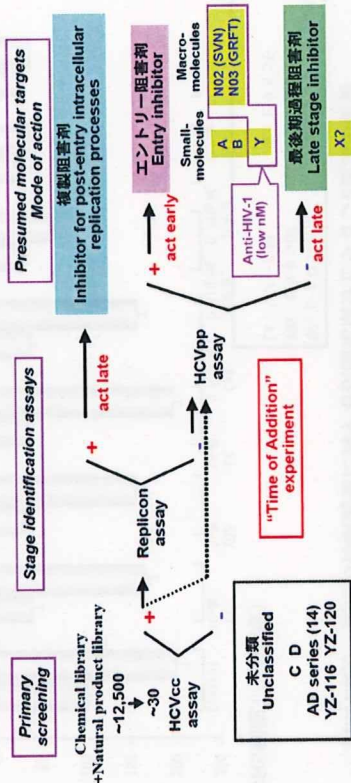


OR6細胞 (72 h処理)
Core
β-actin

OR6/C-5B/KE (1b型) HCV-0株由来)
5' HCV RLuc HCV RES C E1 E2 NS2 NS3 NS4 NS5 NS6 3'

新規HCVエン트리阻害剤の同定とその作用機構の解析 (武部 真由)

[研究目的] JFH-1 HCVcc assayを用いたfull replication screenによって、従来、阻害剤探索に広範に用いられているレプリコン・アッセイによっては探索・評価ができない新しい作用点をもつ阻害剤、特に、これまでにほとんど未開拓の領域であるHCVエントリー阻害剤およびLate stage阻害剤の探索・同定を目指した



抗HCV ヒット化合物のまとめ

Small-molecule/natural product libraries (n=12,500)

HCVcc assay

Relicon assay; HCVpp assay; Time of addition



マンノース特異糖鎖結合タンパク質



Compound	MW	EC ₅₀	EC ₉₀	EC ₉₅	CC ₅₀	CC ₉₀	SI	Active against	Test in progress	Replicon assay	HCVpp assay	Time of addition	Presumed MOA/Target	Late stage? downregulation?	CD81? TJ integrity? TJ integrity?
A	~380	20 nM	1.9 μM	63 nM	10 μM	30 μM	3.0	Active against GT2a, not GT1b	-	-	+	act early	CD81?	-	-
B	~440	1.9 μM	30 μM	78.3 μM	1.240	16.6	1.240	Active against GT2a/1b	-	-	+	act early	CD81?	-	-
X	736.2* (mixture of 2 forms)	1.9 μM	63 nM	78.3 μM	1.240	16.6	1.240	Active against GT2a/1b	-	-	+	act early	CD81?	-	-
Y	437.6	16.9 nM	26.6 μM	53,000	1.400	1.400	1.400	Active against GT2a/1b	-	-	+	act early	CD81?	-	-
Scytovirin	9.7 kDa (95 aa: monomer)	16.9 nM	23.8 μM	1.400	1.400	1.400	1.400	Active against GT2a/1b	-	-	+	act early	Anti-HIV-1 (0.3 nM)	+	+
Griffithsin	13 kDa (121 aa: dimer)	1.8 nM	33.6 μM	9.08x10 ⁴	-	-	-	Active against GT2a/1b	-	-	+	act early	Anti-HIV-1 (0.04 nM)	+	+

まとめと今後の課題

1. 新規感染性HCV株を確立した。不死化肝細胞3次元培養によるHBVおよびHCV感染実験系を樹立した。
2. HCV生活環の解析からSPP活性阻害、PA28γ、La蛋白質など新規抗ウイルス標的を同定した。
3. HCVゲノムRNA結合分子の探索により、抗ウイルス活性を有するアンチセンスRNAを同定した。
4. ウイルス培養系を用いた抗ウイルス薬候補のスクリーニングにより、多くの新規抗ウイルス薬候補を同定した。栄養成分に関しては補助食品としての可能性がある。低分子化合物に関しては作用機序の解明と化合物の最適化を進める。
5. 3年間の研究により、基礎的研究を進ませ、新規治療標的と抗ウイルス薬候補の同定がすすんだ。同様の基盤的研究を進めると同時に臨床応用にむけた開発研究を効率よく進める必要がある。

平成21年度 肝炎等克服緊急対策研究事業 成果概要

研究課題：肝炎ウイルス感染防御を目指したワクチン接種の基盤構築

課題番号：H19-肝炎-一般-005

研究代表者：水落利明

I. 研究の意義

WHO が強く推奨し、193 の加盟国中 171 の国 (88%) で実施されているユニバーサル HB ワクチン接種 (HB-UV) を導入していない数少ない先進国のひとつが日本である。HB ワクチンの高い安全性と有効性は実証されており、HB-UV による急性 B 型肝炎、さらには肝癌発症率の低下も数多く報告されている現況を鑑み、既にわが国は HB-UV 導入の是非について積極的に討議する時期に来ていると考え本研究を実施した。

II. 研究の目的、期待される成果

- (1) HB ワクチンの HBs 抗体誘導能比較および HB ワクチン接種既往者の HBV 感染調査。
- (2) マウス実験モデルを用いた HBV 感染防御に必要な最小抗体価についての検証。
- (3) 医療現場 (特に産科および小児科) における HB ワクチン接種効果と有効性の検証、および HBV 母子感染防御対策の実情把握と今後の改善余地についての検討。
- (4) 近年における HBV 感染経路の変遷 (垂直感染から水平感染) および HBV 遺伝子型を追跡調査、それによる今後の HB ワクチン接種対象者選択についての考察。

III. 3年間の研究成果

・研究代表者 (水落利明)

- (1) 「ユニバーサルHBワクチン接種に関する提言」作成。

・研究分担者 (田中憲一)

- (1) 産科および小児科における HB 母子感染防止対策の現状把握を行った。

・研究分担者 (小方則夫)

- (1) B 型肝炎ウイルス (HBV) 感染防御最小 HBs 抗体濃度の検定を行った。

- (2) HB ワクチンの HBs 抗体誘導能比較および HB ワクチン接種既往者の HBV 感染調査を実施した。

・研究分担者 (岡部信彦)

- (1) 感染症法に基づく感染症発生動向調査で届け出られた症例のデータを集計・解析した。

・研究分担者 (多屋馨子) 研究協力者 (恵谷ゆり)

- (1) 保育士、施設長、看護師、保健師といった職種を対象に、B 型肝炎についての意識調査を実施した。

- (2) 父子感染対策を含め、乳児期早期からの HBV 水平感染対策が非常に重要であることを確認した。

・研究分担者 (片山恵子)

- (1) HBs 抗体の *in-vivo* での感染阻止能を定量的に計測する基礎を確立するための実験を行った。

・研究分担者 (菅内文中)

- (1) 本邦における HBV エスケープミュータント (HBV-EM) の出現率を全国 18 施設で検討し、その変異株の結果を基に *in vitro* で HBV-EM のウイルス学的特徴について検討した。

- (2) ヒト肝細胞キメラマウスを用い、抗 HBV モノクローナル抗体による HBV 中和試験を行った

IV. 今後考えられる新たな課題

- (1) 国内における急性 B 型肝炎患者数の実態把握および HBV 遺伝子型の調査。
- (2) HB-UV 導入を実施する際の①ワクチンの選択 ②接種対象年齢の設定 ③接種スケジュールの再考。
- (3) HB-UV の対費用効果検証。

V. 行政施策への貢献の可能性

- (1) わが国における HB-UV 導入に向けた施策推進に関する提言の作成。
- (2) 開始後 20 年以上経過した「HBV 母子感染予防施策」の再検討と再徹底を上記提言において言及。

VI. 本研究の成果(発表論文・ガイドライン・マニュアル等)研究代表者 (水落利明)

水落利明: 「ユニバーサルHBワクチン接種に関する提言」: 本研究班の総括報告書として提出

研究分担者 (田中憲一)

芹川武大, 田中憲一: 新潟県内におけるB型肝炎母子感染防止対策の実際: 日本産科婦人科学会新潟地方部会誌, 2008. 99: pp 15-18.

研究分担者 (小方則夫)

1. 小方則夫: 医療従事者における B 型肝炎ウイルス (HBV)・C 型肝炎ウイルス (HCV) 陽性血液暴露事故後の感染予防対策: 国際標準との整合性確立にむけて, 伊藤庄平 (監修)、病院機能向上研究結果報告集第 3 号、独立行政法人労働者健康福祉機構 (川崎)、2009、pp 301-313.

2. 小方則夫: B 型肝炎ウイルス (hepatitis B virus: HBV) 感染症対策: 日本において接種可能である (あった) 4 種 HB ワクチンの HBs 抗体誘導能の凝集法 (passive hemagglutination assay) 評価と国際単位表示法 (chemiluminescent immunoassay) 評価との比較検討. 臨床病理 2009; 57: pp 954 - 960.

研究分担者 (岡部信彦)

Kamiya H, Okabe N. Leadership in Immunization: the relevance to Japan of the U. S. A. experience of the Centers for Disease Control and Prevention (CDC) and the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). *Vaccine* 27:1724-8, 2009.

研究分担者 (片山恵子)

1. Tabuchi A, Tanaka J, Katayama K, Mizui M, Matsukura H, Yugi H, Shimada T, Miyakawa Y, Yoshizawa H. Titration of hepatitis B virus infectivity in the sera of pre-acute and late acute phases of HBV infection: Transmission experiments to chimeric mice with human liver repopulated hepatocytes. *Journal of Medical Virology* 80:2064-2068, 2008

2. Komiya Y, Katayama K, Yugi H, Mizui M, Matsukura H, Tomoguri T, Miyakawa Y, Tabuchi A, Tanaka J, Yoshizawa H. Minimum infectious dose of hepatitis B virus in chimpanzees and difference in the dynamics of viremia between genotype A and genotype C. *Transfusion* 48:286-294, 2008

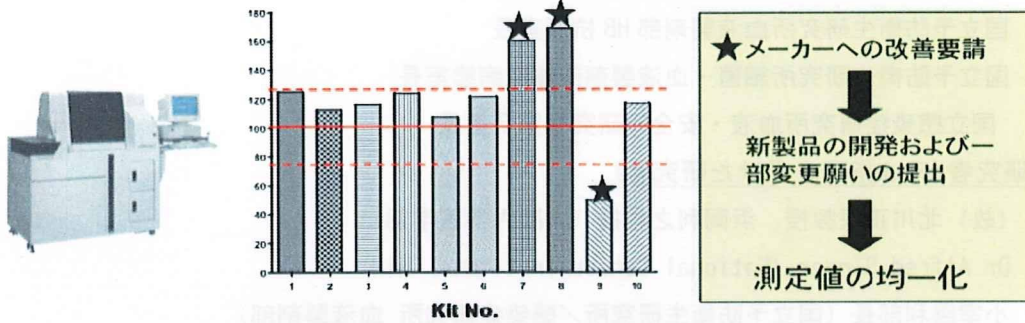
研究分担者 (菅内文中)

1. Kusakabe A, Tanaka Y, Mochida S, Nakayama N, Inoue K, Sata M, Isoda N, Kang JH, Sumino Y, Yatsuhashi H, Takikawa Y, Kaneko S, Yamada G, Karino Y, Tanaka E, Kato J, Sakaida I, Izumi N, Sugauchi F, Nojiri S, Joh T, Miyakawa Y and Mizokami M. A Case-Control Study for the Identification of Virological Factors associated with Fulminant Hepatitis B. *Hepatol Res* 39: 648-656, 2009.

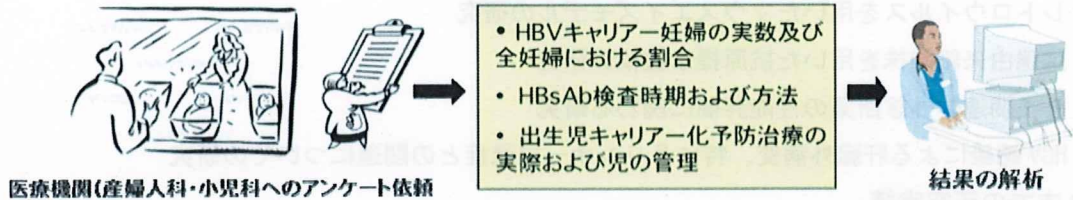
2. Matsuura K, Tanaka Y, Hige S, Yamada G, Murawaki Y, Komatsu M, Kuramitsu T, Kawata S, Tanaka E, Izumi N, Okuse C, Kakumu S, T, Hino K, Hiasa Y, Sata M, Maeshiro T, Sugauchi F, Nojiri S, Joh T, Miyakawa Y, and Mizokami M. Distribution of Hepatitis B Virus Genotypes among Patients with Chronic Infection in Japan Shifting toward an Increase of Genotype A. *J Clin Microbiol* 47:1476-1483, 2009.

Ⅶ. Ⅲ (3年間の研究成果)の概要図等

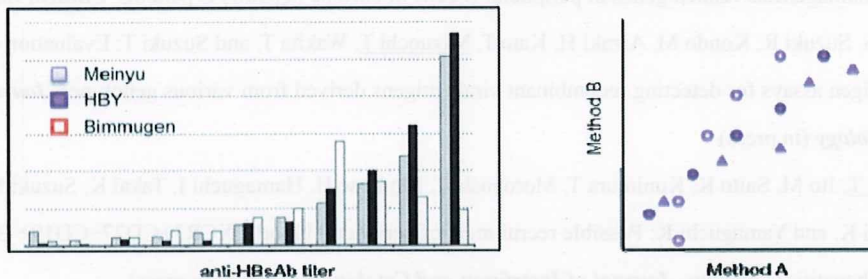
国内で使用されているキットによる抗HBs抗体価測定値の標準化



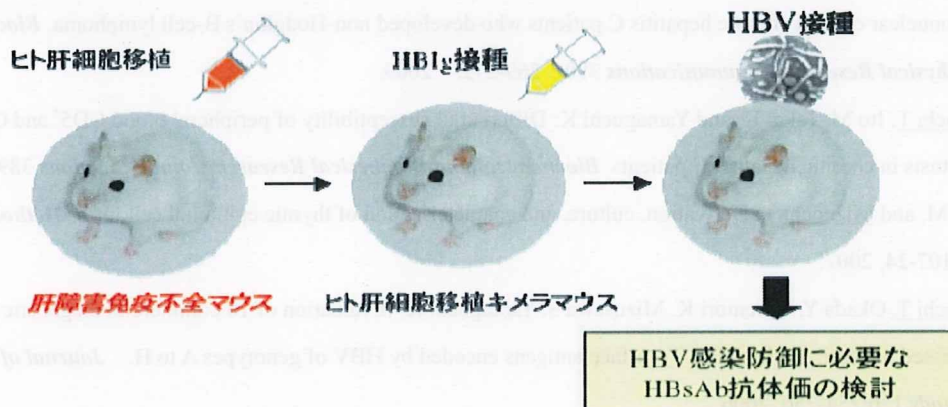
HBワクチンの臨床的効果の検証(アンケート調査)



HBワクチン接種による抗体誘導能比較と測定法による相違



ヒト肝細胞移植キメラマウスを用いたHBV感染実験



○ 研究代表者の研究歴等

・過去に所属した研究機関の履歴

- 1980-1985 大阪大学医学部癌研腫瘍発生学教室 助手
 1983-1987 米国国立予防衛生研究所 (NIH) Visiting Fellow/Associate
 1987-1988 国立予防衛生研究所血液製剤部主任研究官
 1989-1992 国立予防衛生研究所血液製剤部 HB 抗原室長
 1992-2002 国立予防衛生研究所細菌・血液製剤部輸血病態室長
 2002-現在 国立感染症研究所血液・安全性研究部第2室長

・主な共同研究者 (又は指導を受けた研究者)

- 1976-1985 (故) 北川正保教授、浜岡利之教授 (大阪大学医学部)
 1983-1987 Dr. Alfred Singer (National Cancer Institute, NIH)
 1987-2004 小室勝利部長 (国立予防衛生研究所/感染症研究所 血液製剤部)
 2004-現在 山口一成部長 (国立感染症研究所 血液・安全性研究部)

・主な研究課題

- (1) レトロウイルスを用いたマウスエイズモデルの研究
- (2) 胸腺由来細胞株を用いた抗原提示機構の研究
- (3) 肝炎関連体外診断薬の性能評価に関わる研究
- (4) HCV 感染による肝臓外病変、特に B リンホーマ発症との関連についての研究

・これまでの研究実績

1. Ito M, Murakami K, Suzuki T, Mochida K, Suzuki M, Ikebuchi K, Yamaguchi K, and Mizuochi T: Enhanced expression of lymphomagenesis-related genes in peripheral B cells of chronic hepatitis C patients. *Clinical Immunology* (in press)
2. Mohsan S, Suzuki R, Kondo M, Aizaki H, Kato T, Mizuochi T, Wakita T, and Suzuki T: Evaluation of hepatitis C virus core antigen assays for detecting recombinant viral antigens derived from various genotypes. *Journal of Clinical Microbiology* (in press)
3. Mizuochi T, Ito M, Saito K, Kunimura T, Morohoshi T, Momose H, Hamaguchi I, Takai K, Suzuki M, Mochida S, Ikebuchi K, and Yamaguchi K: Possible recruitment of peripheral blood CXCR3+CD27+CD19+ B cells to the liver of chronic hepatitis C patients. *Journal of Interferon and Cytokine Research* (in press)
4. Kasai M, Ueno T, Tanida I, Kominami E, Seki S, Ikeda T, and Mizuochi T: Autophagic compartments gain access to the MHC class II-compartments in thymic epithelium. *Journal of Immunology* 183:7278-7285, 2009.
5. Ito M, Mizoroki F, Takai K, Yamaguchi K, and Mizuochi T: Phenotypes and gene expression profiles of peripheral blood mononuclear cells in chronic hepatitis C patients who developed non-Hodgkin's B-cell lymphoma. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 390 : 269-272, 2009.
6. Mizuochi T, Ito M, Takai K, and Yamaguchi K: Differential susceptibility of peripheral blood CD5⁺ and CD5⁻ B cells to apoptosis in chronic hepatitis C patients. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 389:512-515, 2009.
7. Kasai M, and Mizuochi T: Derivation, culture, and characterization of thymic epithelial cell lines. *Methods Mol Biol.* 380:107-24, 2007.
8. Mizuochi T, Okada Y, Umemori K, Mizusawa S, Yamaguchi K. :Evaluation of 10 commercial diagnostic kits for in vitro expressed hepatitis B virus (HBV) surface antigens encoded by HBV of genotypes A to H. *Journal of Virological Methods.* 136:254-256, 2006.
9. Okada, Y., E. Abe, K. Komuro, and T. Mizuochi: Heterosexual transmission of murine AIDS virus. *Journal of Virology*

- 72:2451-2453, 1998.
10. Hitoshi, Y., E. Sonoda, A. Tominaga, Y. Okada, M. Makino, K. Suzuki, J. Kinoshita, K. Komuro, T. Mizuochi, and K. Takatsu: Delayed progression of a murine retrovirus-induced acquired immunodeficiency syndrome, MAIDS, in X-linked immunodeficiency mice. *Journal of Experimental Medicine* 177:621-626, 1993.
 11. Mizuochi, T., M. Kasai, T. Kokuho, T. Kakiuchi, and K. Hirokawa: Medullary but not cortical thymic epithelial cells present soluble antigens to helper T cells. *Journal of Experimental Medicine* 175:1601-1605, 1992.
 12. Ohnota, H., Y. Okada, H. Ushijima, T. Kitamura, K. Komuro, and T. Mizuochi: 3'-Azido-3'-deoxythymidine prevents induction of murine acquired immunodeficiency syndrome in C57BL/6 mice infected with LP-BM5 murine leukemia viruses, a possible animal model for antiretroviral drug screening. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 34:605-609, 1990.
 13. Mizuochi, T., J. Mizuguchi, T. Uchida, K. Ohnishi, M. Nakanishi, Y. Asano, T. Kakiuchi, Y. Fukushima, K. Okuyama, H. C. Morse III, and K. Komuro: A selective signaling defect in helper T cells induced by antigen presenting from mice with acquired immunodeficiency syndrome. *Journal of Immunology* 144:313-316, 1990.
 14. Mizuochi, T., A. W. Hugin, H. C. Morse III, A. Singer, and M. Buller: Role of lymphokine secreting CD8⁺ T cells in cytotoxic T lymphocyte responses against vaccinia virus. *Journal of Immunology* 142:270-273, 1989.
 15. Mizuochi, T., and A. Singer: Intrathymic differentiation and tolerance induction of lymphokine secreting Lyt-2⁺ T helper cells. *Journal of Immunology* 140:1421-1424, 1988.
 16. Rosenberg, A. S., T. Mizuochi, and A. Singer: Evidence for involvement of dual-function T cells in rejection of MHC class I disparate skin grafts. Assessment of MHC class I alloantigens as in vivo helper determinants. *Journal of Experimental Medicine* 168:33-45, 1988.
 17. Mizuochi, T., L. Tentori, S. O. Sharrow, A. M. Kruisbeek, and A. Singer: Differentiation of Ia-reactive CD8⁺ murine T cells does not require Ia engagement. Implication for the role of CD4 and CD8 accessory molecules in T cell differentiation. *Journal of Experimental Medicine* 168:437-442, 1988.
 18. Mizuochi, T., D. McKean, and A. Singer: IL-1 as a co-factor for lymphokine-secreting CD8⁺ murine T cells. *Journal of Immunology* 141:1671-1575, 1988.
 19. Rosenberg, A. S., T. Mizuochi, and A. Singer: Cellular interactions resulting in skin allograft rejection. *Annals of the New York Academy of Sciences* 532:76-86, 1988.
 20. Shearer, G. M., A. Singer, T. Mizuochi, M. Buller, A. Hugin, and H. C. Morse III: Importance of CD8⁺ T helper cell function in AIDS. *Journal of Infectious Diseases* 158:893, 1988.
 21. Singer, A., T. I. Munitz, H. Golding, A. S. Rosenberg, and T. Mizuochi: Recognition requirements for the activation, differentiation, and function of T helper cells specific for class I MHC antigens. *Immunological Reviews* 98:143-170, 1987.
 22. Caughman, S. W., S. O. Sharrow, S. Shimada, D. Stephany, T. Mizuochi, A. S. Rosenberg, S. I. Katz, and A. Singer: Ia⁺ murine epidermal Langerhans cells are deficient in surface expression of class I MHC. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 83:7438-7442, 1986.
 23. Rosenberg, A. S., T. Mizuochi, and A. Singer: Analysis of T-cell subsets in rejection of K^b mutant skin allografts differing at class I MHC. *Nature* 322:829-831, 1986.

・平成22年度 肝炎等克服緊急対策研究事業への新規研究課題の応募状況

「B型肝炎ウイルス新規感染阻止を目指したワクチン接種の基盤構築」(応募申請予定)
 (B型・C型肝炎ウイルス新規感染状況の把握と新規感染防止に関する研究 (22201201))

厚生労働科学研究 肝炎等克服緊急対策研究事業

「肝炎ウイルス感染防御を目指したワクチン接種の基盤構築」
(H19肝炎—般-005)

平成19年度-21年度

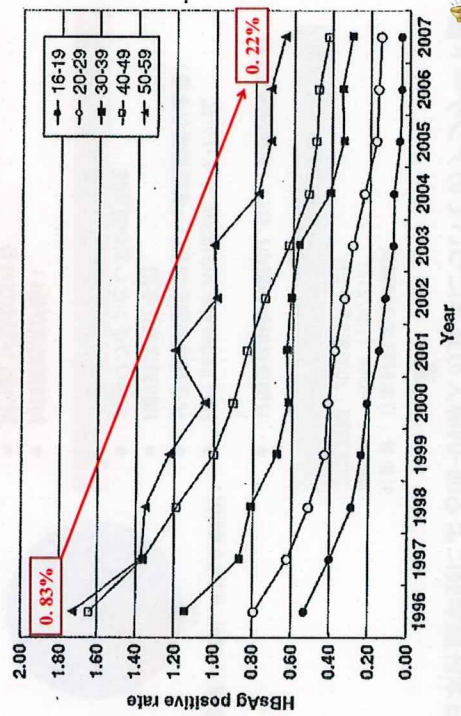
研究代表者：水落 利明（国立感染症研究所）

本研究発足の背景

- 国内では現在、医療従事者などのハイリスクグループおよびHBVキャリア妊婦からの出生児に対してHBワクチン投与を行っている
 “Selective Vaccination” が実施されている
 しかし国際的には全出生児に対してHBワクチン投与を行う
 “Universal Vaccination”が主流である
- HBV感染経路が母子（垂直）感染から水平感染へと推移している
- 国外から流入したと考えられる”genotype A” HBVの新規感染が増加している
- HBワクチンは高い安全性と強い免疫賦与能を有しており、さらには癌予防ワクチンの側面も持っている
 “Decreased incidence of hepatocellular carcinoma in hepatitis B vaccinees: a 20-year follow-up study”
 by D.-C. Chen et al. in JNCI (2009)

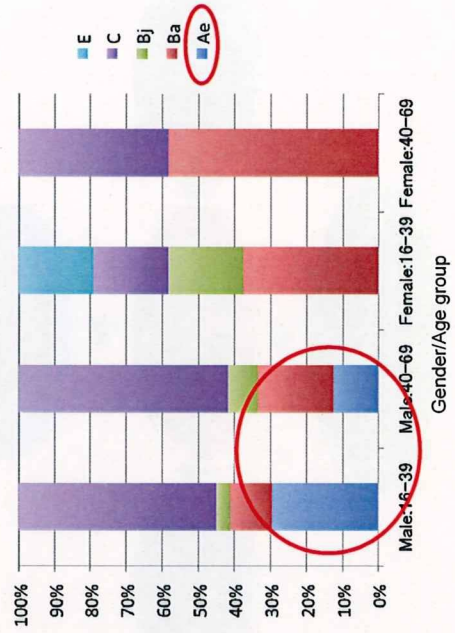
“HB Universal Vaccination” 導入について議論するべきでは？

Age-time-dependent rate of HBsAg-positive first-time blood donors from 1996-2007 in Japan



Yoshikawa et al. Transfusion Med. 2009

HBV genotype/subgenotype of IgM-HBcAb-positive and NAT-positive donors



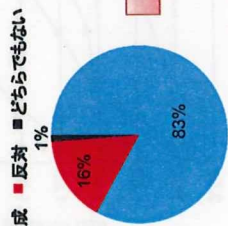
Yoshikawa et al. Transfusion 2009

日本肝臓学会によるHB-UV導入の是非についてのアンケート調査

対象者：日本肝臓学会評議員
回収率：～65% (139/213)
実施時期：2009年2月～5月

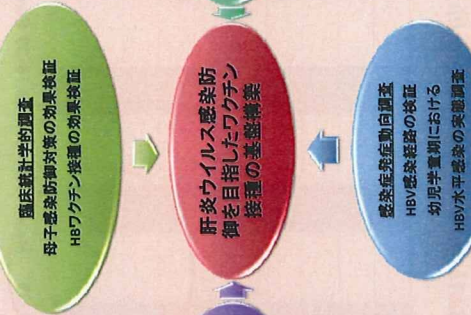
ユニバーサルHBワクチンに賛成する主な理由

- B型急性肝炎が減少しない(実数把握が必要)
- HBV genotype Aの増加とキャリア化
- 父子感染の割合が高い(実数把握が必要)
- HBV再活性化予防
- 抗癌ワクチンとしての有用性



ユニバーサルHBワクチンに反対する主な理由

- 対費用効果が低い
- 副作用が懸念される
- Escape Mutant HBV (変異ウイルス) の出現
- 現在の母子感染予防策で十分



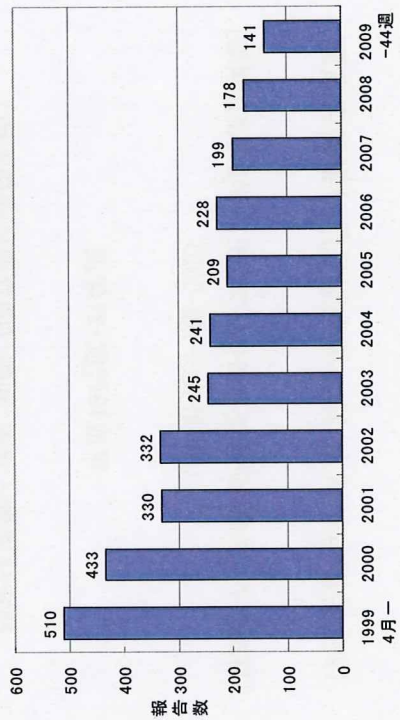
臨床科学的調査
母子感染予防策の効果検証
HBワクチン接種の効果検証

HBs抗体診断用キット
国内で販売/使用さ
れている抗HBs抗体価
定量キットの性能検証

肝炎ウイルス感染防
御を目指したワクチン
接種の基礎構築

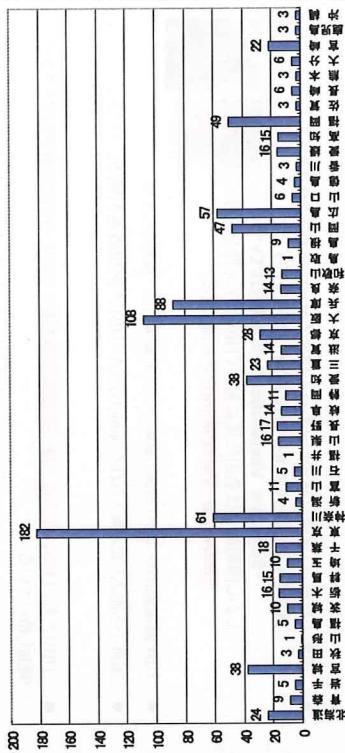
感染症発症動向調査
HBV感染経路の検証
幼児学重期における
HBV/水疱性感染の実態調査

B型肝炎年別報告数 1999年(4月)～2009年(44週)



感染症発症動向調査2009年11月4日現在

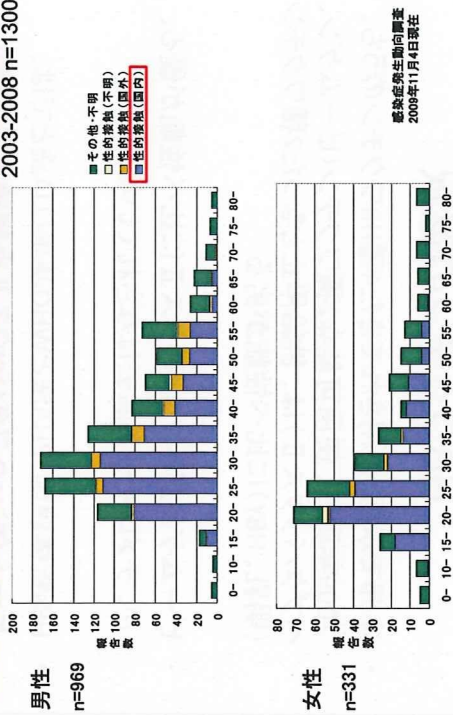
都道府県別報告数 (2004-2008年(5年間累積報告数 n=1,055))



1例(山形、福井、鳥取)～182例(東京)

感染症発症動向調査2009年11月4日現在

性別・感染経路別(性的接触/感染地域別)年齢分布 2003-2008 n=1300



B型肝炎母子感染防止対策の 周知徹底について

(平成16年4月27日雇児母発第0427001号)

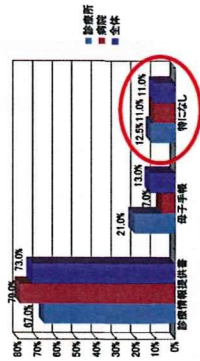
- B型肝炎母子感染防止のための処置が適切に行われていない症例が厚生科学研究において報告されている
- 母子感染を起こすおそれがある妊婦に対して、B型肝炎母子感染防止について周知徹底(広報紙、リーフレット、ポスター等)するよう指示

母子(垂直)感染防止対策の実態

- **標準予防措置が行われなかった症例の存在**
 - 出生直後のHBIG非投与: 1例
 - 2ヶ月時HBIG非投与: 6例
 - HBワクチン非投与: 4例
 - HBワクチン投与2回以下: 8例
- **産科から小児科への連絡不徹底の可能性**
 - HBVキャリア化例なし、全国では脱落例でのHBVキャリア化例あり。
- **母子(垂直)感染を予防しても、その後の水平感染の可能性が残る**

産科から小児科への引き継ぎの実態

- 産科アンケート
 - 診療情報提供書(紹介状): 73%
 - 母子手帳への記載のみ: 13%
 - 特になし: 11% (院内、口頭での回答あり)
 - (退院時小児科医の診察があるため: 1施設)
- 小児科アンケート
 - 診療情報提供書(紹介状): 73%
 - 母子手帳への記載のみ: 7%
 - 特になし: 20% (院内、口頭での回答あり)



小児のHBV水平感染の実態に関する検討

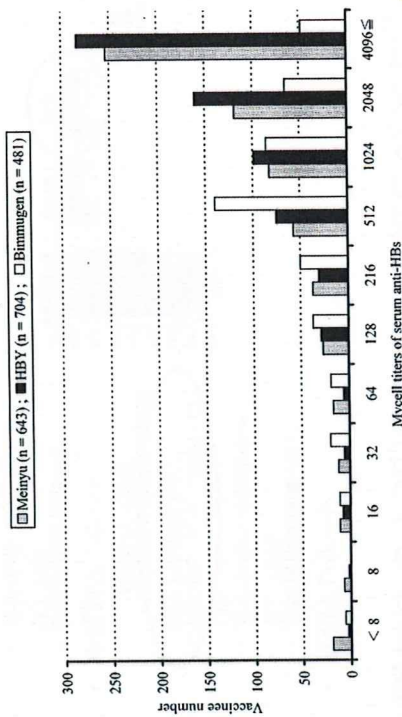
一昨年度、昨年度の本研究班では、乳幼児が集団で生活している保育施設の実態と、金沢市にある保育施設の長(主任保育士)、一般保育士のB型肝炎に対する意識について調査したが、今年度は、金沢市内の民間保育施設の看護士および金沢市に勤務している保健師を対象として同様の調査を実施し、水平感染のリスクについて検討することを目的とした。

- 保育関係者への正確な情報の提供と感染症に関する啓発が必要(特に、血液や浸出液に関する注意事項の徹底が必要)
- 昨年、一昨年に実施した施設長と保育士への調査とは異なり、今年度は医療関係者への調査であったこと、昨年度、本研究班の結果説明を兼ねて研修会を開催したこともあり、知識保有率は高かったが、まだ不十分な点も残されていた。
- B型肝炎ウイルスを保有している、していないにかかわらず、血液媒介感染症全体に対する啓発が必要であり、B型肝炎に関しては、知識の普及と並行して、WHOが推奨している**Universal vaccinationの必要性があると思われる。**

HBワクチンの選択

- 本邦で承認・使用されてきた4種HBワクチンのうち、2009年現在、使用可能な2種ワクチン(ビームゲン、ヘプタバックスII)は、供給停止となった2種ワクチン(明乳、HBV)に比べ性能が劣る。
- ビームゲンがヘプタバックスIIに比べ性能が優る、が、チメロサル除去はなされていない。
- HBs抗体評価: PHA法とWHO基準CLIA法とでは、ビームゲン・ヘプタバックスII各接種者で乖離が大きい

明乳・エッチビーワイ・ビームゲン接種者のHBs抗体反応: PHA法(マイセル)凝集価別、人数分布



HBIG受動免疫後のHBV感染実験

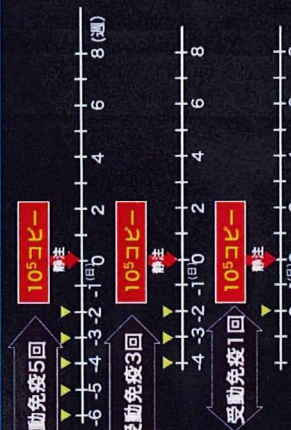
対象と方法

- 使用マウス: ヒト肝細胞腫移植キメラマウス: 各群3匹ずつ3群 × 2、計18匹
- HBIG: 抗HBs人免疫グロブリン(日赤製) 200×10³ mIU/ml
1回投与量: HBIG 50ul / 1回 (後脚大腿部に左右交互に筋注)
- HBIG 5回連日投与、3回連日投与、1回連日投与、の3群
- HBIG投与終了2日後に**HBV genotype Aを10⁵コピー接種**、**HBV genotype Cを10⁵コピー接種**
- HBV DNA: nested PCRにて検出。
- microparticle EIA法 (AxSYM®) にてHBs抗体価 (mIU/ml) を同時測定

プロトコール

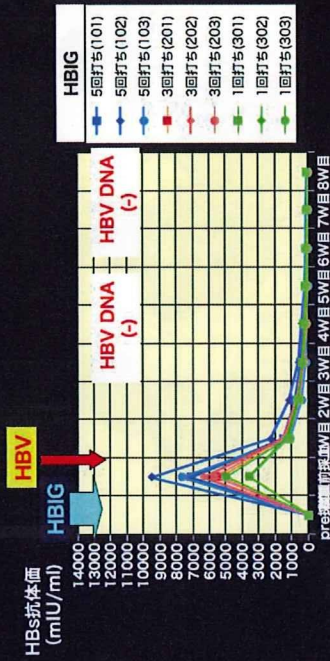
受動免疫 + HBV(genotype A& genotype C)
投与回数を調節

接種材料：1)HBV genotype A、P-57原液100ul = 10⁵コピー相当を接種
2)HBV genotype C、P-29原液100ul = 10⁵コピー相当を接種



1) HBV genotype A 接種

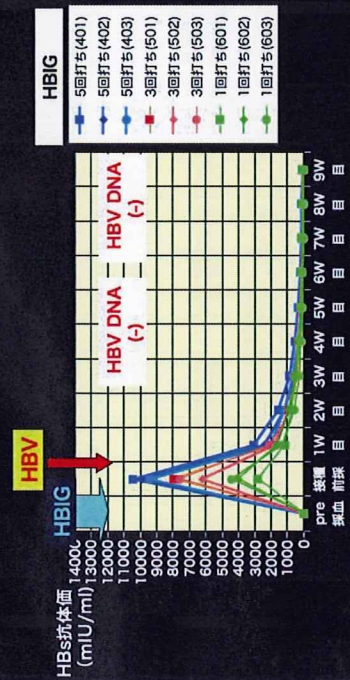
末梢血中のHBs抗体価の推移



3群すべて感染防御成立

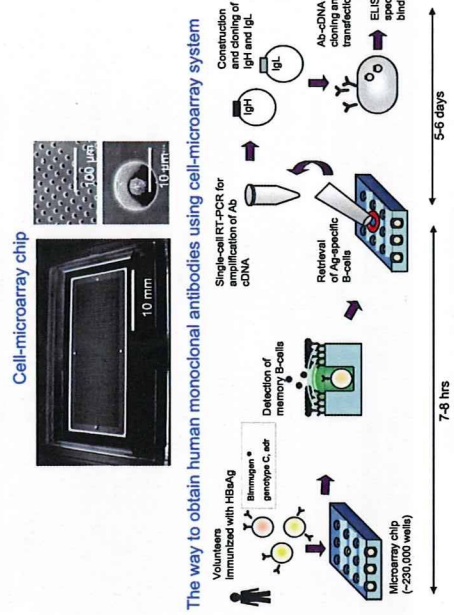
2) HBV genotype C 接種

末梢血中のHBs抗体価の推移



3群すべて感染防御成立

細胞マイクロアレイを用いた抗HBVモノクローナル抗体の作製



対象・投与方法

group	n	感染源		抗体		経路	頻度
		Genotype	接種量 (copies/匹)	容量 (μ L/匹)	投与量 (μ g/匹)		
1	3	C	1.0×10^4	50	0.1	50	単回
2	3	A	1.0×10^4	50	10	50	単回
3	3	C	1.0×10^4	50	10	50	単回
4	3	C_145R	1.0×10^4	50	10	50	単回

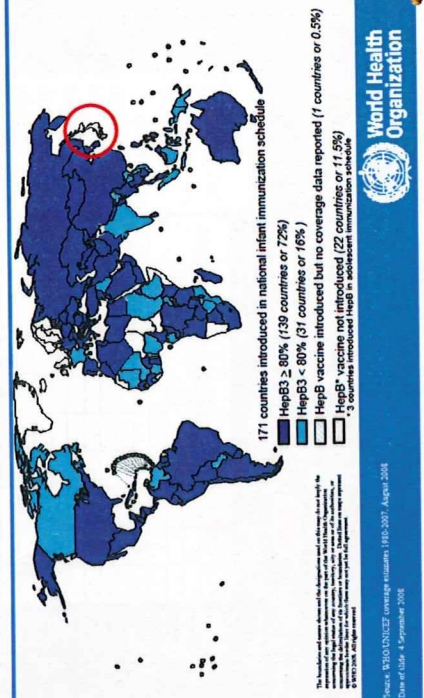
結果 (実験継続中)

Genotype	mouse #	HBV DNA (copies/well)	HBV DNA (copies/ml)	抗体投与量 (μ g/匹)
C	101	negative	negative	0.1
	102	negative	negative	0.1
	103	2.8×10	1.1×10^4	0.1
A	201	negative	negative	10
	202	negative	negative	10
	203	negative	negative	10
C	301	negative	negative	10
	302	negative	negative	10
	303	negative	negative	10
C_145R	401	2.8×10	1.1×10^4	10
	402	8.3×10	3.3×10^4	10
	403	negative	negative	10

HB-UVに関する議論が活発に!

- 第44回日本肝臓学会総会 (2008.6) ワークショップ「B型肝炎ウイルスワクチンの今日的課題」(司会: 溝上雅史、小池和彦)
- 第45回日本肝臓学会総会 (2009.6) ワークショップ「ユニバーサルHBワクチン: 是非か?」(司会: 小池和彦、田中靖人)
- 第57回日本化学療法学会総会 (2009.6) シンポジウム「ワクチン戦略をめぐる諸問題」(座長: 岡部信彦)
- 第13回日本ワクチン学会学術集会 (2009.9) ワークショップ「B型肝炎ワクチン (HBワクチン)」(座長: 神谷 齋、渡辺 博)
- 第13回日本肝臓学会大会 (2009.10) 特別企画「本邦におけるHBワクチン戦略はいかにあるべきか?—アジア諸国との比較」(司会: 藤澤知雄、四柳 宏)
- 第46回日本肝臓学会総会 (2010.5) ワークショップ「B型肝炎の母子および水平感染の実態とワクチン戦略」(司会: 溝上雅史、四柳宏)

Countries having introduced HepB vaccine and infant HepB3 coverage, 2007



至急検討すべき項目

1. 国内での急性B型肝炎発症者数及びHBウイルス性状の把握
2. HBワクチンの選択接種年齢の設定と追加接種必要性の検討
3. 医師を含めた啓発・教育活動の推進
4. 対費用効果の検証

母子感染防止対策再徹底
&
ユニバーサルHBワクチン接種



平成 21 年度 肝炎等克服緊急対策研究事業 成果概要

研究課題：non-coding RNA を用いた新たな慢性 C 型肝炎制御による治療法開発

課題番号：H19-肝炎一般-006

研究代表者：村上善基

I. 研究の意義

(1) 日本人に多い C 型肝炎ウイルス遺伝子型 1b 型に罹患している慢性 C 型肝炎では現在の標準的な治療方法では奏効率が 50-60%前後であるため有効な治療方法の開発が望まれている。

(2) 慢性肝炎は進行すると線維化が起こり肝硬変、肝癌に至る、肝線維化の制御は有効な発癌対策となっている。

II. 研究の目的、期待される成果

(1) ウイルス性慢性肝疾患（慢性肝炎、肝硬変、肝細胞癌）に得られたマイクロ RNA 発現プロファイルを用いて、炎症、線維化の進展、発癌のメカニズムを明らかにする。

(2) HCV を認識するマイクロ RNA を利用した有効で副作用の少ない慢性 C 型肝炎治療の確立を目標とする。

(3) ウイルスの遺伝子型、線維化、炎症の程度、インターフェロン治療応答性、性別、年齢、ウイルス感染期間、など患者個別の情報に応じた副作用の少ないテーラーメイド治療を確立する。

(4) 血清中の exosome 画分中のマイクロ RNA を用いた新たな慢性肝疾患の（特に肝細胞癌）バイオマーカー作成を行なう。

(5) ウイルス性肝疾患における肝線維化の進行を規定する遺伝子、又ウイルスの感染性を規定する遺伝子を同定することによって、ウイルスの感染から慢性肝疾患の進展防止にわたるメカニズムを明らかにする。

(6) 肝発癌に関係したマイクロ RNA を同定し、網羅的に標的遺伝子を同定するアルゴリズムを作成することにより、肝発癌のメカニズムを明らかにし、マイクロ RNA 解析の有効なツールの作成を試みる。

III. 3年間の研究成果

・研究代表者

(1) HCV に感染したヒト肝組織を持つキメラマウスを用いて miR-199a*が HCV の複製効率を低下させる事を示した。マイクロ RNA の投与方法を変えると、その効果が増強す

る事が判明した。また HCV 感染前にマイクロ RNA を過剰発現するとその後のウイルスの複製効率が抑制される事を示した。

- (2) 慢性 C 型肝炎の肝線維化の程度別 (F0-3) のマイクロ RNA 発現プロファイルを作成し、肝線維化の進展に関係するマイクロ RNA を同定した (投稿中)。
- (3) 慢性 C 型肝炎の肝線維化の進行の程度を規定する遺伝子を同定した (投稿準備中)。
- (4) 慢性 C 型肝炎に対してペグインターフェロン・リバビリン併用療法の治療効果に関与するマイクロ RNA を同定した、また治療効果別に作成したマイクロ RNA 発現プロファイルを用いて併用療法治療効果予測方法を確立した (投稿中)。
- (5) 肝癌組織中に高発現しているマイクロ RNA 非癌部組織での発現は抑制されているが、はマウス胎生期にも高発現した。このマイクロ RNA は肝癌診断の新たなバイオマーカーとなりうる事が示された。
- (6) 血清中 exosome 画分のマイクロ RNA を用いて肝細胞癌治療前後でその発現が変化する事を示し、肝細胞癌特異的なバイオマーカーとして利用できる事が明らかになった (論文 revision 中)。

・分担研究者(井ノ上逸朗)

- (1) マイクロ RNA のターゲット遺伝子を絞り込むための新たな解析ツールの作成。
- (2) 肝発癌に関与するマイクロ RNA の標的遺伝子同定とその機能解析

・分担研究者(下遠野邦忠)

- (1) HCV 感染にアポリポタンパク質 E (Apo-E) が重要な働きをしていることを明らかにした。
- (2) 特に Apo-E のアイソフォームの違いにより HCV の感染性が異なることを明らかにした。

IV. 今後考えられる新たな課題

- (1) in vivo で標的臓器に持続的にマイクロ RNA を発現させる投与方法の開発とその際における副作用 (off target) の対策。
- (2) 薬剤応答効果予測、肝線維化診断の正確性を高めるために異なった施設で採取した解析を行ない、症例数を増やす。
- (3) RNA を用いた新規抗ウイルス治療や、新規肝線維化治療方法作成のための実験系の作成。

V. 行政施策への貢献の可能性

- (1) ペグインターフェロン+リバビリン併用療法効果予測方法を用いたテーラーメイド治療の確立 (治療患者の選択、治療期間の増減) により、副作用の少ない、より有効性の高い治療の提供。
- (2) 肝線維化診断方法を用いた発癌を含めた慢性肝疾患患者の予後予測を行ない、適切

な経過観察方法（検査の種類、検査の回数）の確立。

(3) 末梢血マイクロ RNA を利用した肝癌とそれ以外の肝疾患診断への応用。

VI. 本研究の成果(発表論文・ガイドライン・マニュアル等)

(1) 村上善基 (主任研究者)

論文

1. Yamamoto Y, Kosaka N, Tanaka M, Koizumi F, Kanai Y, Mizutani T, Murakami Y, Kuroda M, Miyajima A, Kato T, Ochiya T. MicroRNA-500 as a potential diagnostic marker for hepatocellular carcinoma. *Biomarkers*. 2009 Nov;14(7):529-38.
2. Murakami Y, Aly HH, Tajima A, Inoue I, and Shimotohno K. Regulation of the Hepatitis C Virus genome replication by miR-199a*. *Journal of Hepatology*. 2009; 50: 453-460

学会発表

村上善基 マイクロ RNA 発現プロファイルを用いた慢性 C 型肝炎ウイルス治療効果予測
第 13 回日本肝臓学会大会. 平成 21 年 10 月 15 日。京都市

発明特許

慢性 C 型肝炎の治療効果予測方法 特願 2009-229977 村上善基

遺伝子発現解析を用いた肝線維化の評価方法 京都大学発明評価委員会より国内特許出願予定 村上善基 (京都大学との供願)

(2) 井ノ上逸朗(分担研究者)

論文

Murakami Y, Aly HH, Tajima A, Inoue I, and Shimotohno K. Regulation of the Hepatitis C Virus genome replication by miR-199a*. *Journal of Hepatology*. 2009; 50: 453-460

(3) 下遠野邦忠(分担研究者)

論文

1. Murakami Y, Aly HH, Tajima A, Inoue I, and Shimotohno K. Regulation of the Hepatitis C Virus genome replication by miR-199a*. *Journal of Hepatology*. 2009; 50: 453-460
2. Ogawa K, Hishiki T, Shimizu Y, Funami K, Sugiyama K, Miyanari Y, Shimotohno K. Hepatitis C virus utilizes lipid droplet for production of infectious virus. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci*. 85: 217-228, 2009