

る。この検査結果報告書を用いて担当医が結果説明を行うとともに、検査オーダー医の了解のもと、病院長名で検査結果報告書が直接患者へ郵送され、「肝炎相談センターでの肝炎相談」が可能となる仕組みである。2013年7月から本システムが稼働するとともに、腹部超音波検査件数が15%増加したと報告された。

一方、大阪市立大学では、電子カルテ上で患者個人の「Information Board」内の「伝言メモ」欄に、肝炎検査陽性の場合には「主治医殿 本日の検査で○△陽性と検出されました。肝胆膵内科への院内紹介をご考慮下さい。中央臨床検査部」などのコメントが入力される仕組みである。2013年度から本システムが導入されたことにより、前年度に比べ、肝胆膵内科への院内紹介件数が1カ月あたり18.8件から28.4件へ約10件増加したと報告された。

肝炎検診・検査後の効率的なフォローアップシステム構築に資する重要な取り組みであり、同時

に病院経営にも利するものと評価されよう。肝炎患診療連携拠点病院をはじめ、全国の医療機関へのさらなる普及が期待される。

おわりに

肝炎検診は、一般のがん検診や成人病検診などとは異なり、基本的には「一生に一度」受検するだけで、B型・C型肝炎ウイルスキャリアの拾い上げが可能な検診である。肝炎総合対策の一環として、国は多額の公費を投じて肝炎検診の推進に取り組んでいる。医療者側も固定概念に拘泥することなく、肝炎検診の重要性を再度認識する必要がある。さらに、検診受検者へのフィードバックを遅滞なく遂行するためには、検診・検査後の効率的なフォローアップシステムの構築に向けて一層の注力が囑望される。

文 献

- 1) Tanaka J, Koyama T, Mizui M, et al : Total numbers of undiagnosed carriers of hepatitis C and B viruses in Japan estimated by age- and area-specific prevalence on the national scale. *Intervirology* 54 : 185-195, 2011
- 2) <http://www.mhlw.go.jp/bunya/kenkou/kekakukansenshou09/pdf/kensa-10.pdf>
- 3) <http://www.mhlw.go.jp/bunya/kenkou/kekakukansenshou09/pdf/kensa-11.pdf>
- 4) <http://www.mhlw.go.jp/stf/houdou/2r9852000002gd4j.html>
- 5) 八橋 弘 : 厚生労働科学研究費補助金(難病・がん等の疾患分野の医療の実用化研究事業)「病態別の患者の実態把握のための調査および肝炎患者の病態に即した相談に対応できる相談員育成のための研修プログラム策定に関する研究」平成24年度研究報告書, 平成25年3月
- 6) <http://www.kanen.ncgm.go.jp/>
- 7) http://www.kanen.ncgm.go.jp/co_20140117.html

ウイルス性肝炎の動向とワクチン

正木尚彦*

要旨

- ・ウイルス性急性肝炎の中で、A型とB型はワクチン接種による感染予防が可能な疾患である。
- ・臨床医はこれらのワクチン接種を実施すべき局面を熟知し、かつ、感染予防に十分な抗体価を獲得するには規定回数のワクチン接種を受ける必要のあることを対象者に説明せねばならない。
- ・わが国の若年層は性行動の変容に伴って、欧米型のB型肝炎ウイルスに対する感染リスクの増大に曝されている。
- ・諸外国のようにユニバーサルワクチネーション導入の道を選択すべきかに関してはいまだ議論の余地があるものの、ウイルス肝炎の疾病構造の急速な変化に遅滞なく対応することが医療行政に求められている。

はじめに

急性肝炎の原因となる主な肝炎ウイルスとしてA型、B型、C型、D型、E型の5種類が知られているが、このうち、ワクチンによる予防が実用化されているのはA型とB型のみである。なお、E型については最近中国からワクチン開発の報告がなされているが、遺伝子型に依らず長期間の有効性があるか、妊産婦への安全性は確保されているか、などに関する点はいまだ明らかにされていない。

わが国における急性肝炎の動向

「感染症の予防及び感染症の患者に対する医療

に関する法律第12条第1項」において、経口感染によるA型・E型急性肝炎は四類感染症として「診断後直ちに最寄りの保健所に届出する」こと、血液・体液感染によるB型・C型急性肝炎は五類感染症として「診断後7日以内に最寄りの保健所に届出する」ことが、診療担当医に義務付けられている。これに基づいた年間発症数が国立感染症研究所ホームページ上に公開されている¹⁾(図1)。

A型肝炎は以前は散発的な大流行を繰り返していたが、直近では2010年に小流行を認めるのみである。B型肝炎の発症数は2007年以降年間200例以下にとどまっているが、厚生労働省研究班による全国31施設の後ろ向き研究²⁾の結果、医師による届出率は5~6%ときわめて低率であった。さらに、DPCデータを用いたまったく別の手法による入院患者数の推計³⁾では、2007年2,175人、2008年2,391人と報告されており、届出率が

*国立国際医療研究センター肝炎情報センター〔〒272-8516 市川市国府台1-7-1〕MASAKI Naohiko

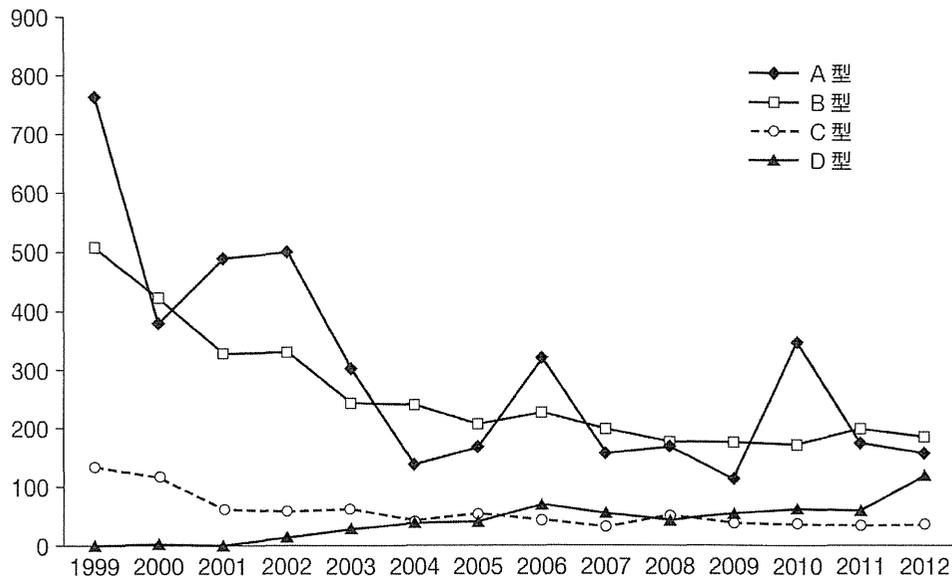


図1 わが国における急性肝炎の年次別報告数の推移(感染症研究所への届出実数)

きわめて低い実態を裏付けるものであった。なお、C型急性肝炎の報告数は過去10年間少数ながら横ばいで推移している。一方、E型急性肝炎は医療者側における認知度の向上、あるいは昨今のジビエブームを反映したものが、報告数が漸増している。

ウイルス性急性肝炎の発症数に関する定点観測を行っている国立病院機構肝疾患ネットワークでは、輸血後と散発性に分けて成因別発症数をモニターしている⁴⁾。散発性については1980～1990年代はA型が首位であったが、その後12～16%と減少し2000年以降はB型が約40%を占めている(図2)。

A型肝炎ワクチンによる感染予防

開発途上国では、5歳頃までに90%以上が不顕性感染し終生免疫(HA抗体)を獲得するが、先進国では未感染者が多い。わが国はその中間に位置しているが、衛生環境の改善・整備とともに感染

の機会が減少したため、2003年の血清疫学調査では、60歳以上では70%以上のHA抗体保有率であったが、中年層(60～40歳)では急激に減少し、40歳以下ではほぼ0%であった⁵⁾。この傾向はさらに進んでおり、2010年時点では55歳未満の世代ではほぼ0%と推定されている⁶⁾。すなわち、若年～中年層がA型肝炎ウイルス(HAV)感染に対してきわめて無防備な状態になっており、A型肝炎浸淫地域への海外渡航者への感染、学校・施設などでの集団発生、家族内感染などがいつでも起こり得る状況にある。

A型肝炎ワクチンは、国産の不活化ワクチンが1994年10月に16歳以上を対象として製造承認され、1995年6月に市販された(エイムゲン®:化血研)。なお、16歳未満の使用制限についても2013年3月に撤廃された。標準的接種法として、0.5 μgずつを2～4週間隔で2回筋肉内または皮下に接種し、さらに初回接種24週後に追加することが推奨されている。

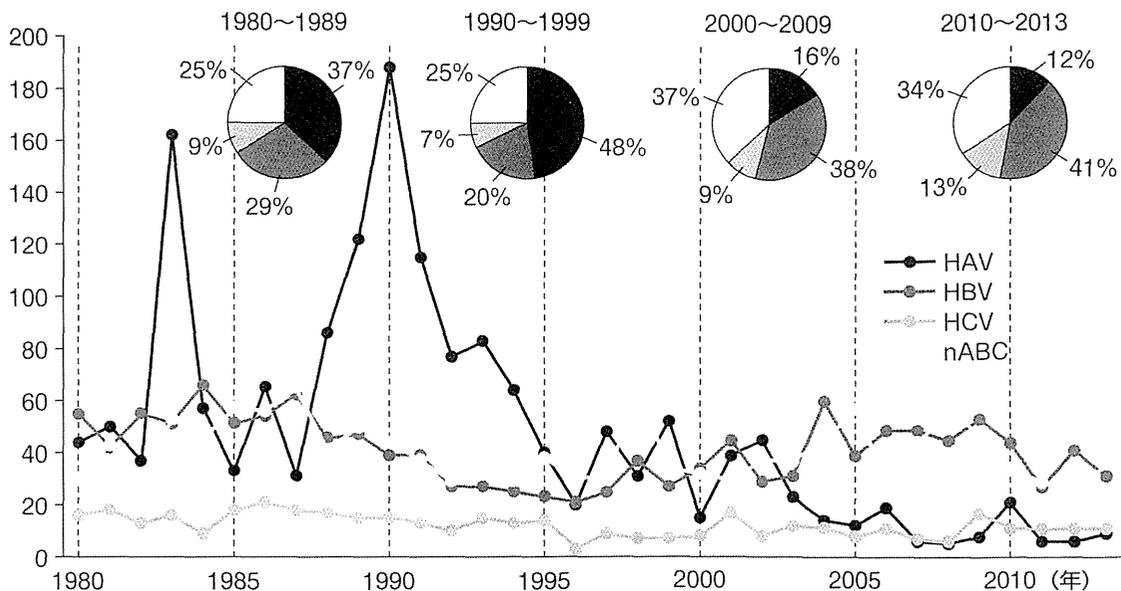


図2 散発性急性肝炎の型別年次推移(国立病院機構肝疾患ネットワーク 34 施設による定点観測)

1980～2013年に計 4,766 例が登録された。

B 型肝炎ワクチンによる感染予防

現在、わが国で使用可能な B 型肝炎ワクチンは、酵母由来の組換え沈降ワクチンであるビームゲン®(化血研：わが国に多いゲノタイプ C 由来)、ヘプタバックス-II®(Merck & Co Inc：欧米型のゲノタイプ A 由来)の 2 種類である。その製剤比較を表に示す。現在、① B 型肝炎の予防：性交渉のパートナーが B 型肝炎ウイルス(HBV)キャリアの場合や医療スタッフにおける感染予防、② 母子感染予防(抗ヒト免疫グロブリンとの併用)、③ HBs 抗原および HBe 抗原陽性の血液による汚染事故後の B 型肝炎発症予防(抗ヒト免疫グロブリンとの併用)の三つに適応がある。一般的な「B 型肝炎の予防」目的での使用は保険給付の対象外であるが、血友病患者に限っては対象とされている(平成 2 年 3 月 30 日付。事務連絡)。

予防接種のスケジュールは、① B 型肝炎の予防：0.5 ml ずつを 4 週間隔で 2 回、さらに 1 回目

の接種から 20～24 週後の計 3 回を皮下または筋肉内に接種する(10 歳未満では 0.25 ml ずつ)。② 母子感染予防：平成 25 年 10 月から早期接種方式(国際方式)へ変更されており、出生後できるだけ早い時期(12 時間以内が望ましい)に抗 HBs ヒト免疫グロブリン(HBIG)1 ml を筋肉内投与、HB ワクチンは 0.25 ml を生後 12 時間以内を目安として皮下注射し、さらに 0.25 ml ずつを初回接種の 1 カ月後および 6 カ月後の 2 回接種するスケジュールである。母親が HBe 抗原陽性キャリアの場合、旧方式では生後 2 カ月目にも HBIG を追加投与していたが、新方式では省略可とされた。③ 汚染事故の場合：曝露後なるべく早く(遅くとも 48 時間以内)HBIG を投与する(1,000～2,000 単位)。HB ワクチンは 0.5 ml を曝露後 7 日以内に皮下または筋肉内に注射し、さらに同量を初回の 1 カ月後、3～6 カ月後の 2 回接種する(労災保険または健康保険の適用あり)。

能動免疫によって獲得された HBs 抗体価は経年的に低下することから、血液曝露など感染リスクの高い医療従事者などでは定期的な抗体価測定

表 B型肝炎ワクチンの製剤間比較

製品名	ビームゲン	ヘプタバックス-II
販売元	化血研	Merck & Co Inc
販売	化血研・アステラス製薬	MSD 株式会社
発売年月日	1988年6月21日	1988年6月20日
由来	酵母	酵母
組成(1 ml 中)		
HBs 抗原蛋白	20 µg(adr)	20 µg(adw)
その他	水酸化アルミニウム 0.5 mg 以下 ホルマリン 0.01 w/v%以下 チメロサル 0.001 w/v%(10 ppm) 塩化ナトリウム 8.5 mg リン酸水素ナトリウム水和物 2.58 mg リン酸二水素ナトリウム 0.44 mg	アルミニウムヒドロキシホスフェイト 硫酸塩(アルミニウム換算) 0.5 mg 塩化ナトリウム 9.0 mg ホウ砂 70 µg
適応	B型肝炎の予防 母子感染予防 汚染事故後	○ ○ ○
保険適用(当該・既存負傷)		
業務上	労災	労災
業務外	健保など	健保など
抗体陽転率	皮下 96.0% 筋注 94.6% 男性/女性 92.7%/98.2%	90.2% 95.0%
副反応発現症例率	9.93%	6.23% (1.6%:チメロサル除去製剤)
重大な副反応	ショック・アナフィラキシー様症状, 多発性硬化症, 急性散在性脳脊髄炎, Guillain-Barré 症候群	ショック・アナフィラキシー様症状, 多発性硬化症, 急性散在性脳脊髄炎, Guillain-Barré 症候群, 脊髄炎, 視神経炎, 末梢神経障害
過敏症	0.1~5% 0.1%未満	発熱, ほてり 悪寒, 発疹, 瘙癢, 蕁麻疹
局所症状(注射部位)	疼痛, 瘙癢感, 腫脹, 硬結, 発赤, 熱感	疼痛, 発赤, 硬結, 腫脹, 瘙癢感, 熱感
消化器症状	嘔気, 下痢, 食欲不振	嘔気, 嘔吐, 腹痛, 下痢, 食欲不振
精神神経系	頭痛, 眠気, 眩暈	頭痛, 違和感, 眠気, 眩暈, 痙攣
その他	倦怠感, 違和感, 関節痛, 筋肉痛	倦怠感, 手の脱力感, 多汗, 感冒様症状, 耳痛, 血小板減少症, 血管炎, 関節炎
参考にした医薬品インタビューホーム作成時	2013年4月	2013年4月

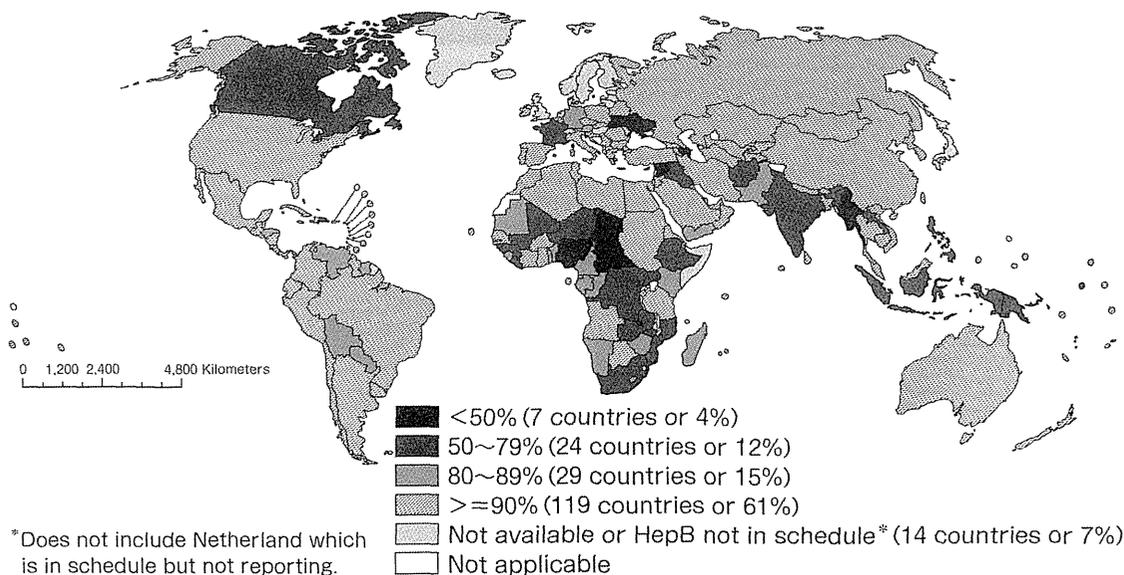


図3 新生児へのユニバーサルワクチネーションのカバー率(2012年)

を行い、陰性化した場合には追加接種(ブースター)を行うべきとする考え方が一方、過去のワクチン接種で十分量の抗体価を獲得し得た個体の場合、HIV感染者などの免疫不全患者やHBs抗原陽性者との性交渉・注射針共用パートナーを除いては、抗体価測定およびブースターは不要とする考え方もある(2006年CDCガイドライン⁷⁾)。

わが国では、いわゆる欧米型(ゲノタイプA)のHBVが急速に国内に浸淫し、2003年以降B型急性肝炎の約40%を占めている⁹⁾という現状がある。このゲノタイプAは他のゲノタイプとは異なり、慢性化しやすいという特性がある(7~8%)¹⁰⁾。これらの状況を踏まえ、日本肝臓学会などでは早期にUVを導入すべきと提言を行っているところであるが、いまだ承認されていない。

B型肝炎ユニバーサルワクチネーション(UV)の動向

海外にはHBVキャリア率が8%以上の高浸淫国が東南アジア、アフリカ、アラスカなどに広く存在し、多くは出生時の母子感染に起因することから、WHOは5歳児のHBVキャリア率2%以下を到達目標とし、その手段としてB型肝炎ワクチン接種、特にすべての児(新生児、学童)にワクチンを接種するUVを勧奨してきた。2012年時点で世界182カ国がUVを採用し、148カ国(76%)において3回接種実施率80%以上であった⁸⁾(図3)。UV非採用の先進国は、日本、英国、北欧3国などきわめて少数である。

おわりに

以上、A型、B型肝炎ワクチンを中心に概説した。なお、予防接種法による定期接種ではなく、任意の予防接種として乳幼児へのHBV UVを行政措置として採用し、一部ないし全額の公費助成を行っている自治体(市区町村)が増加しつつある。評価されるべき施策であろう。

文 献

- 1) <http://www.nih.go.jp/niid/ja/all-surveillance/2085-idwr/ydata/3222-report-ja2011.html>
- 2) 溝上雅史：B型肝炎のジェノタイプA型感染の慢性化など本邦における実態とその予防に関する研究。厚生労働科学研究費補助金(肝炎等克服緊急対策研究事業)平成23年度総括研究報告書, pp79-85
- 3) Sako A, Yasunaga H, Horiguchi H, et al : Acute hepatitis B in Japan : The incidence, clinical practices and health policy. *Hepato Res* **41** : 39-45, 2011
- 4) 八橋 弘：本邦におけるウイルス性急性肝炎の発生状況と治療法に関する研究。病態別の患者の実態把握のための調査および肝炎患者の病態に即した相談に対応できる相談員育成のための研修プログラム策定に関する研究。厚生労働科学研究費補助金(難病・がん等の疾患分野の医療の実用化研究事業)平成25年度総括研究報告書, pp137-144
- 5) Kiyohara T, Sato T, Totsuka A, et al : Shifting sero-epidemiology of hepatitis A in Japan, 1973-2003. *Microbiol Immunol* **51** : 185-191, 2007
- 6) 岡部信彦, 多屋馨子：A型肝炎。予防接種に関するQ & A集, 一般社団法人日本ワクチン産業協会, 東京, 2013, pp175-178
- 7) CDC : Sexually Transmitted Diseases Treatment Guidelines, 2006. *MMWR Recommendations and Reports* **55**(RR11) : 1-94, 2006
<http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/rr5511a1.htm>
- 8) WHO : Progress Towards Global Immunization Goals-2012. Summary presentation of key indicators. Updated July 2013
http://www.who.int/immunization/monitoring_surveillance/SlidesGlobalImmunization.pdf
- 9) Tamada Y, Yatsubashi H, Masaki N, et al : Hepatitis B virus strains of subgenotype A2 with an identical sequence spreading rapidly from the capital region to all over Japan in patients with acute hepatitis B. *Gut* **61** : 765-773, 2012
- 10) Ito K, Yotsuyanagi H, Yatsubashi H, et al : Risk factors for long-term persistence of serum hepatitis B surface antigen following acute hepatitis B virus infection in Japanese adults. *Hepatology* **59** : 89-97, 2014

「成人病と生活習慣病」バックナンバー

- 43巻 (2013年) 定価 (本体2,600円+税)
第12号 (12月) 特集 インクレチン関連薬による糖尿病治療の新時代
- 44巻 (2014年) 定価 (本体2,700円+税)
- | | | |
|------------|------|---------------------------------|
| 第1号 (1月) | 特集 | 子どもから防ぐ成人病・生活習慣病 |
| 第2号 (2月) | 特集 | 臓器障害の薬剤投与—注意と禁忌薬 |
| 第3号 (3月) | 特集 | ここまで来た, 炎症性腸疾患の新展開 |
| 第4号 (4月) | 特集 | こんな神経症状から始まる悪性腫瘍
—傍腫瘍症候群を中心に |
| 第5号 (5月) | 特集1. | 抗血小板療法・抗凝固療法—リスクとベネフィット |
| | 特集2. | 職域健診を活かした生活習慣病対策 |
| 第6号 (6月) | 特集 | 消化器がん検診の現状とこれから |
| 第7号 (7月) | 特集 | 心臓弁膜症診療のニューパラダイム |
| 第8号 (8月) | 特集 | DIC—病態に基づいた治療 |
| 第9号 (9月) | 特集 | 全身成人病としてのCOPD |
| 第10号 (10月) | 特集 | 生活習慣病における水と塩 |
| 第11号 (11月) | 特集 | 女性の脳卒中と心筋梗塞 |

*発行1年以内のバックナンバーのご注文ならびに在庫照会は下記までご連絡下さい。

東京医学社販売部

〒101-0051 東京都千代田区神田神保町2-20-13 Y's コーラルビル
TEL 03-3265-3551 FAX 03-3265-2750



201423047A(別添)

厚生労働科学研究費補助金

肝炎等克服実用化研究事業（B型肝炎創薬実用化等研究事業）

B型肝炎創薬実用化等研究事業の評価等に関する研究

平成26年度 総括・分担研究報告書（別添）

研究成果の概要

研究代表者 正木 尚彦

平成27(2015)年3月

平成 26 年度 厚生労働科学研究費補助金 肝炎等克服実用化研究事業
(B型肝炎創薬実用化等研究事業) の研究課題に関して、平成 27 年
1 月 27 日に開催された研究発表会・中間事後評価委員会への提出資料を
まとめた。

平成26年度 肝炎等克服実用化研究事業（B型肝炎創薬実用化等研究事業）
研究成果概要及びプレゼンテーション資料

目 次

(3年目)

満屋 裕明	B型肝炎ウイルス感染症に対する新規の治療薬の研究・開発	— 1
小嶋 聡一	次世代生命基盤技術を用いたB型肝炎制圧のための創薬研究	— 17
脇田 隆宇	B型肝炎ウイルスの感染複製機構の解明に関する研究	— 31
上田 啓次	B型肝炎ウイルス感染受容体の分離・同定と感染系の樹立及び感染系による病態機構の解析と新規抗HBV剤の開発	— 41
下遠野 邦志	HBVの感染初期過程を評価する系の開発とそれを用いた感染阻害低分子化合物およびレセプター探索	— 53
成松 久	B型肝炎ウイルスにおける糖鎖の機能解析と医用応用技術の実用化へ	— 63
加藤 直也	B型肝炎癌における自然免疫の機能解明とその制御による発癌抑止法開発	— 75
藤田 尚志	B型肝炎の新規治療薬を開発するための宿主の自然免疫系の解析に関する研究	— 87
金子 周一	HBV cccDNAの制御と排除を目指す新規免疫治療薬の開発	—103
溝上 雅史	人工キメラ遺伝子と肝臓特異的な輸送担体の開発を基盤とした肝臓内HBV DNA不活化を目指した新規治療法の開発	—117
森屋 恭爾	B型肝炎ウイルスの完全排除等、完治を目指した新規治療法の開発に関する包括的研究	—163
田中 靖人	B型肝炎ウイルスの持続感染を再現する効率的な培養細胞評価系の開発に関する研究	—189
小原 道法	ツパイ全ゲノム解析に基づくB型肝炎ウイルス感染感受性小動物モデルの開発に関する研究	—207
竹原 徹郎	免疫系を保持した次世代型B型肝炎ウイルス感染小動物モデルの開発とその応用	—221
茶山 一彰	革新的な動物モデルや培養技術の開発を通じたHBV排除への創薬研究	—233
山村 研一	ヒト/チンパンジー・マウスハイブリッド技術を利用したB型肝炎ウイルス感染モデルマウスの開発	—263
正木 尚彦	B型肝炎創薬実用化等研究事業の評価等に関する研究	—273

(2年目)

村上 善基	B型肝炎ウイルス構造解析による薬剤応答性の評価と新規治療薬開発に関する研究	—285
落谷 孝広	エクソソームを介したHBV感染及び発がんメカニズム解明と治療戦略	—301

3 年目研究課題

平成 26 年度 肝炎等克服実用化研究事業 B型肝炎創薬実用化等研究事業『成果概要』

研究課題：B型肝炎ウイルス感染症に対する新規の治療薬の研究・開発
課題番号：H24-B創-肝炎-一般-002
予定期間：H24年度からH28年度まで
研究代表者：満屋 裕明
所属研究機関：熊本大学 大学院
所属部局：生命科学研究部 血液内科・膠原病内科・感染免疫診療部
職名：教授・診療科長
委託費(決定額)：1年目 399,255,000 円 2年目 350,000,000 円 3年目 311,000,000 円
計 1,060,255,000 円

I. 研究の意義

本研究は日本と世界で広く用いられている B 型肝炎ウイルス (HBV) の核酸系逆転写酵素 (RT) 阻害剤である entecavir (ETV) 等と同等あるいは更に強力で、かつ耐性プロフィールが ETV 等とは異なり、耐性発現の出現を許さない(又は著しく遅延させる)新規の薬剤をデザイン・合成・同定し、臨床開発へと進めようとするものである。本プロジェクトは新規の HBV 感染症治療薬の臨床開発に特化、焦点を定め、新規の候補薬の合成・探索・同定を一義的な目的とし、HBV をトランスフェクトした肝癌細胞株によるハイスループットな薬剤評価系を開発、HBV 各遺伝子型感染肝炎モデル動物を用いてリード化合物を評価、要に応じて特許申請等を行いながら、最適化 (optimization) を進め、PK/PD 及び安全性の検討を同時的に行い、前臨床、早期臨床試験を視野に入れたプロジェクトとし、実用化に繋ぐ。本プロジェクトでは以下の 3 点を中心に研究を展開する。

- (1) HBV 治療薬の開発には標的蛋白質の一つである逆転写酵素の機能解析と結晶構造解析が必須であるが、逆転写酵素の機能と立体構造については十分に理解されているとは言えない。本研究では HBV 治療薬の標的の一つである逆転写酵素 (RT) の微細構造を解析し、創薬研究の加速を図る。
- (2) 現在、本邦では lamivudine (3TC)、adefovir (ADV) と ETV が B 型肝炎の治療薬として臨床で用いられている。しかし、HBV はこれらの薬剤に対して耐性を獲得、治療効果が失われる症例が出現している。耐性化した HBV に有効で、より強力でかつ耐性発現を許さない(あるいは著しく遅延させる)新規の薬剤をデザイン・合成・同定して、既存薬よりも優れた新規 B 型肝炎治療薬の創成を図る。
- (3) HBV には、A-J までの遺伝子型が特定されており、臨床病態が異なる。病態を解析し、新規治療薬を開発するためには、HBV をトランスフェクトした肝癌細胞株によるハイスループット薬剤評価系の確立とともに、HBV 各遺伝子型を感染させた肝炎モデル動物による薬剤評価を進める。

II. 研究の目的、期待される成果

(1) 本研究では新規化合物のデザイン・合成を目途(もくと)として、結晶解析学などを駆使した HBV の逆転写酵素の活性部位の微細構造の解明に着手する。既に満屋研究グループは未発表誘導体を始めとして 150~170 個のヌクレオシド誘導体を手にしており、少なくともその一部は HIV-1 RT に対して一定の阻害能を有している事を確認している。本プロジェクトではヌクレオシド系 RT 阻害剤に必ずしも限定せず、必要に応じて抗 HIV 剤として既に確立されている非ヌクレオシド系 RT 阻害剤で HBV 活性を有する物質をも対象として探索・デザイン・合成・同定を進める。研究代表者(満屋)は既に 3 種類の HIV の逆転写酵素 RT 阻害剤の臨床応用に成功しており、HBV の RT 阻害剤の初期開発の経験も有することから実薬の開発に成功する可能性は高いと期待される。また第二世代のプロテアーゼ阻害剤で HIV 感染症/AIDS のファーストライン治療薬として世界中で汎用されている darunavir の開発にも成功しており、本プロジェクトによって RT 阻害剤とは異なったクラスの実薬開発に成功する可能性も低くないと期待される。そのようなリード化合物が同定されれば、HBV 変異株をヒト肝細胞キメラマウスに感染させた肝炎モデル動物を用いて、HBV 遺伝子型や各種変異体における新規抗ウイルス薬の評価を行い、劇症肝炎や肝線維、肝発癌などの病態に与える影響についても検討を重ねる。

III. 3 年間の研究成果

・研究代表者：満屋裕明(天野将之・鎌田伸好)

我々は抗 HBV 活性と抗 HIV-1 活性を有すると期待される新規に合成された核酸アナログと研究室が保持する核酸アナログライブラリー合わせて 150-170 の化合物について、MT2 細胞を標的細胞とした MTT assay 法により、ヒト T 細胞由来の細胞株である MT2 細胞に対する細胞毒性、加えてヒト肝癌由来の細胞株である HepG2 細胞に対する細胞毒性を評価した。その結果、60 化合物が MT-2 細胞に対して、50 化合物が HepG2 細胞に対して明らかな毒性を示さなかった (EC_{50} 値が $100 \mu\text{M}$ より高かった)。抗 HIV 活性を示した化合物は 150-170 個中 32 化合物で、 EC_{50} 値は $0.0001-0.8681 \mu\text{M}$ であった。抗 HIV 活性は野生 HIV-1 株、MT2 細胞を用いた MTT assay 法によって測定した。抗 HBV 活性の測定は、持続的に HBV を産生する Hep2.2.15 細胞およびリアルタイム PCR 法を用いて評価した。結果、15 種類の核酸アナログ (YMS-1143, -1144, -1145, -3072, KMA-35-52, KMA-36-177, SK13-092b, KMA36-183, KMA36-166, TOM-II-20, KMA-XL-117, MRI-III-57, Fluoro-ETV, YMS-14010, YMS-14011) において EC_{50} 値が $0.0003-0.436 \mu\text{M}$ の濃度で HBV の増殖を抑制する事を確認した。

・研究分担者

(安武義晃) HBV Pol の結晶化を目指した安定な可溶性サンプルの取得に向けて、以下の方針で研究を行い、

以下のような結果を得た。1)可溶性向上を目指した融合蛋白質発現:溶解性の向上が期待できる GST、MBP、GFP、チオレドキシシン蛋白質と断片化した Pol との融合蛋白質として発現を行った。2)会合パートナーとの共発現: Pol は感染細胞内にて pgRNA やコア蛋白質と相互作用するとされる。これらとの共発現により安定な複合体状態での Pol の取得を試みた。3)リフォールディング:様々な Pol 断片を大腸菌にて封入体として取得し、グアニジンによる変性可溶性の後、リフォールディングを行った。結果、酢酸バッファー存在下で、TP ドメインを大量に可溶性で得ることに成功した。しかし動的な光散乱・CD スペクトル解析の結果、TP は正しい構造体ではないことが示唆された。また、RT ドメインを含む領域を封入体で取得し、変性状態で Ni アッフニティ樹脂に結合させたまま巻き戻したサンプルを大量に取得した。しかし、プライミングアッセイを行った結果、活性は検出されなかった。4)ホモログ蛋白質及びキメラ蛋白質の作成:構造生物の分野では、ターゲット蛋白質の由来生物を変えることで、劇的に可溶性・生産性が向上することがある。これは、蛋白質の機能がその溶解度とは無関係であるためである。そこで、白雁、リス、ゴリラ、ウーリーモンキーHBV Pol 遺伝子(アミノ酸配列相同性:40-85%程度)を全合成し、ヒトHBV Pol 同様に全長および断片の発現テストを行った。結果、いずれの場合も著しい不溶性であった。つまり、ヒトHBV Pol の著しい不溶性の性質は、HBV Pol に共通の機能や構造と深い関係にあることが示唆された。

(尾曲克己) B 型肝炎ウイルス(HBV)の新規阻害剤の開発には、阻害剤の標的蛋白質の立体構造情報が必要である。阻害剤の標的蛋白質である HBV ポリメラーゼの逆転写領域(RT)の立体構造を原子レベルで明らかにするために、RT の結晶構造解析を行っている。本分担研究では、昆虫細胞発現系とコムギ無細胞発現系を利用して、RT の発現系の開発を行っている。本年度は、無細胞発現系にて、RT ドメインの発現を確認し、可溶性画分に取得できることを確認した(概要図1)。現在、これらが結晶構造解析に利用できるか検討を行っている。さらに、創薬等支援技術基盤プラットフォームの支援を受けて、哺乳類細胞での発現の検討を行い、この発現蛋白質が可溶性画分に取得でき、活性を持つ蛋白質である可能性が示唆された。

(原口一広(向後悟)) 今年度は、課題1~6を設定した。課題1:4'-置換-2'-デオキシプリンヌクレオシド誘導体(A)の合成;課題2:4'-置換-2'-デオキシピリミジンヌクレオシド誘導体(B)の合成;課題3:炭素環ヌクレオシド誘導体(C)の合成;課題4:3'-置換 BCA 誘導体(D)の合成;課題5:フルオロエンテカビル(E)の合成;課題6:4'-アジド-4'-チオデオキシヌクレオシド(F)の合成。合成を達成した化合物数は、課題1は10検体、課題2は4検体、課題3は3検体、課題4は3検体そして課題5は2検体、課題6は6検体であった(合計28検体)。概要図2に、課題1~課題6で合成した化合物を示した。

(井本修平) ①アシクロ型ヌクレオシドの合成:今回、我々は新たな抗 HBV 薬候補化合物として、エンテカビルとアデホビルの構造的特徴を併せ持つハイブリッド型新規ヌクレオシド誘導体 L-ala-P-MEB-G(1)と Piv-P-MEP-G(2)を設計し、合成と抗 HBV 活性評価を行った。その結果、Piv-P-MEP-G(2)は弱い抗 HBV 活性 IC50 値は 0.29 μ M を示したが、細胞毒性が認められた(CC50: 39 μ M)(概要図3A)。②4'-アジド-2'-デオキシプリンヌクレオシドの合成:昨年度我々は、4'-N3-N6Me-dDAP(3)をはじめとして、C4' 位にアジド基を持つプリン 6 位置換ヌクレオシド群が、毒性無く一定の抗 HBV 活性を保持している可能性を見だしていた。今年度は、さらに概要図3B に示す化合物 4-10 を合成し抗 HBV 活性を評価した。その結果、全ての化合物が毒性を有しておらず、抗 HBV 活性が確認された。これらの系統的な合成から、6 位の置換基が大きすぎると抗 HBV 活性は弱くなることが示唆された。今後 C4' 位にアジド基を持つピリミジン 4 位置換誘導体を合成予定である。

(田中靖人) B 型肝炎ウイルス(HBV)の変異株を含めた病態を解析し、新規治療薬の開発を目指している。(1)1.24 倍長 HBV 複製モデルの野生株を基に作成した各薬剤耐性変異株を、ヒト肝細胞キメラマウスに接種し、感染性 HBV 粒子を獲得した。また、(2)新規の核酸アナログ候補化合物 24 種類のスクリーニングを行った結果、2 種の化合物で HBV-DNA 抑制効果が認められた。さらに、上記 2 種の化合物を(3) Genotype Ce 野生株と ETV 耐性株をトランスフェクトした HuH-7 細胞へ添加した結果、ETV と同程度に HBV 複製を抑制した。そこで、(4)HBV Genotype Ce 野生株と ETV 耐性変異株を感染させたキメラマウスに 2 種の化合物を投与して、抗 HBV 効果を検討した。その結果、2 種の化合物では野生株、ETV 耐性株ともに ETV と同用量(0.02 mg/kg)の投与で HBV-DNA 量を抑制する効果が認められた(概要図4)。

現在、上記化合物とは別に、HBV 抑制の認められた低毒性の新規化合物 X についても(4)を検討予定である。

(児玉栄一) 抗 HBV 剤の開発に欠かせない high through-put screening と耐性ウイルスへの効果判定を簡便化・迅速化・高精度化させるために HBV 高発現細胞の樹立とその応用としての in vitro 感染系の確立のために検討を行っている。まず、subtype C のウイルスクローンを 1.3 倍体として CMV promoter-artificial intron 下流にクローニング、HepG2 細胞に遺伝子導入し、G418 で選択後、培養上清中に放出されるウイルス量を定量 PCR で検討したが、HepG2.2.15.7 細胞と同等もしくは発現量が低下していた。Limiting dilution 法を行い、高発現細胞を分離しようと試みたが、発現量の回復は見られなかった。経過中に徐々に発現量が低下しており、おそらく強力な CMV promoter の影響でサイレンシングが増強していると考えられた。現在、プロモーターレスで HBV 由来のプロモーターを利用したベクターを構築中である。次に HBV の pX タンパクは、HBV の転写を促進することが知られているが、これを欠損させてもウイルス産生能に対する影響は大きくないことが報告されている。一方で細胞毒性が強く、Pol 同様にタンパクを回収することが非常に困難であり、HTLV や HIV の Tax/Tat と対照的である。そのため、pX 領域にオーバーラップしてコードされている Pol の発現に影響がないように stop コドンを点突然変異法で導入したウイルスゲノムを構築し、HBV 遺伝子を導入したあとの HBV 産生細胞の負担を少なくし、産生量を増やすべく、ベクターを構築中である。上記2つのウイルス側からのアプローチに加えて、細胞側からのアプローチとして近年 HBV のレセプターとして注目されてきている NTCP をクローニングし、その高発現細胞を HepG2、Huh7 細胞などの肝細胞以外にも検討している。これらの中から感染効率のより良い細胞を検討している。これまでの解析では HepG2 や Huh7 等の肝細胞由来の細胞では RT-PCR にて低いレベルで NTCP が発現しているが、浮遊細胞で

あるリンパ球系細胞では nested-PCR にても全く発現が見られないことが明らかとなった。これらに関しても遺伝子導入を行い、感染効率の良い細胞を見出す予定である。もし、低レベルであっても HBV の継代培養が可能となれば耐性ウイルスの分離や逆転写酵素以外を標的とする薬剤開発が可能となる。

(青木学) 本研究の分担研究者、井本博士により合成された新規化合物について抗 HBV、HIV 活性および細胞毒性について評価を行った。昨年度第 2 回の班会議では、C4 位にアジド基を持つヌクレオシド誘導体について、抗 HBV 活性は良好である(IC50: 2.7-67 nM, ETV は 0.36 nM)が、活性の高いものは同時に細胞毒性も低濃度で見られる(CC50: 3.8-6.6 μM)ことを報告した。今年度は抗ウイルス活性を維持したまま細胞毒性を軽減すべく、塩基を修飾した新規 9 化合物について活性の評価を行った。結果、細胞毒性は全て 100 μM 以上と良好であったが、抗 HBV 活性は 41-530 nM とこれまでの一連の化合物と比較し活性の低下が見られた。また糖の C3 位を修飾した化合物および糖を開環した新規化合物それぞれ 2 種についても抗 HBV 活性を測定したが際立った活性は見られなかった(290~>1000 nM)。

(小田切優樹) 4'-CN-2'-deoxyinosine (SK14-061a), 4'-CN-2'-deoxyguanosine (SK13-140), 4'-ethynyl-2'-deoxyadenosine (SK14-013) の体内動態検討に向けた検討として、定量用質量分析計 Xevo G2 TOF システムを用いた K14-061a, SK13-140, SK14-013 の検出条件の設定を行った。その結果、上記 3 化合物とも Xevo G2 TOF システムにおいてシャープなピークが検出され、その検出限界は、SK14-061a: 10 ng/mL, SK13-140: 10 ng/mL, SK14-013: 100 pg/mL であった。また、全ての化合物において良好な検量線も作成できた (0-500 ng/mL)。定量用質量分析計を用いて体内動態評価する際には、除タンパクの作業が必須項目であるとともに、除タンパク作業後においても目的化合物の回収率の向上に努める必要がある。そこで、ヒト血清中に化合物を混合し、除タンパク条件の検討を行った。まず、一般的な除タンパク法である有機溶媒による除タンパクを試みたが、3 化合物ともにピークの分裂やブロード化が起こり、有機溶媒による除タンパクは不適であると判断した。次に固相カラム Oasis MCX/WCX を用いて検討を行った。Oasis WCX は SK-061a の保持が全くなかったが、Oasis MCX では脱離段階(化合物の抽出段階)で SK-061a の抽出が可能であったため、Oasis MCX が最適な除タンパクカラムであると判断した。しかしながら、推奨プロトコルでは回収率が非常に悪い(約 30%)ので、プロトコルの改訂を行い Oasis MCX により SK-061a を抽出する際に有機溶媒(メタノール)とアンモニアを最適濃度にする必要があると分かった。しかしながら、上記した有機溶媒を用いた除タンパク時と同様に、有機溶媒(メタノール)とアンモニアの存在下では LC-MS による目的化合物の定量に大きく影響を与えた(ピークのブロード化が起こる)。この問題は、有機溶媒とアンモニアを除去することで解決すると考え、遠心エバポレータで有機溶媒とアンモニアを揮発させ、移動相で再溶解することでシャープなピークを得ることができた。現在、SK13-140 と SK14-013 の最適カラムの選定及びカラムからの抽出条件の設定と 3 化合物の臓器内濃度の検出条件の検討を行っている。その後、マウスにおける各化合物の体内動態評価を行う予定である

(榎本信幸) 臨床的立場から HBV 治療の現状と問題点の情報収集・解析を行い、新規薬剤の治療対象・治療目標を明らかとすること、また病態と関連する HBV 変異・ウイルスマーカの臨床的意義を明らかにすることが本班における役割の一つである。平成 26 年度はエンテカビルを中心とした核酸アナログ導入症例において、肝炎病態とウイルスマーカ等の変化について検討した(N=193)。導入後、肝逸脱酵素や HBV-DNA は速やかに低下するものの、肝内 HBV-cccDNA 量を反映すると考えられている HBs 抗原量、あるいは HB コア関連(cr)抗原量の低下は緩やかであり、導入後の肝発癌率も 5 年で 12% も存在した。HBs 抗原量、あるいは HB コア関連(cr)抗原量は、肝炎の臨床病期の進行、すなわち免疫寛容期、HBeAg 陽性肝炎、HBeAg 陰性肝炎、比活動性キャリアと進むにつれて、両抗原量ともに次第に低下した。一方、肝硬変あるいは肝癌などの肝病態進展症例では、HBs 抗原量低値かつ HBeCr 抗原量高値症例に多く、これら進展症例では両抗原量に乖離が生じていた。HBs 抗原量低値、かつ HBeCr 抗原量高値症例は Fibroscan で計測した肝硬度値も有意に高く、特に肝病態の進展しやすい群であると考えられた。

(助永義和) 最適化誘導体合成を継続し、複数のリード化合物が創製されつつある。権利化を推進し特許出願できる新規医薬品候補創製を目指すため、新規性調査は必至の過程である。研究分担者は「誘導体合成された化合物の新規性調査を行う」「広い安全域など医薬品候補として画期的な新規化合物を発見し、物質・製法に関する特許出願を行う」ことを目標として研究を行っている。(1)新規性調査法: SciFinder 解析ソフトを使用して、構造式より検索を行う。(2)特許出願の条件検討: 医薬品候補として特許出願に選定する方法として、探索的 ADMET を疾患標的分子・リード化合物に合わせた選択法で行う。核酸アナログはホスト・ミトコンドリアポリメラーゼとの選択性を優先する。最適化誘導体合成継続過程で、安全域の広い医薬品候補となる基本骨格を発見した。この新規化合物複数個を中心に特許出願を行い、追加実施例も努力・検討する。

(田中康博) JCRAC データセンターの整備を実施している。昨年度までの活動は主に、(1)データマネージメント業務の標準化、(2)品質管理体制の強化、であった。今年度は、データマネージメント業務の標準化と品質管理を臨床試験データマネージメントシステムとして実現させるための基盤整備、としている。JCRAC データセンターがデータマネージメント業務として請け負う個々の臨床試験毎に、開発業者に委託して EDC (Electronic Data Capture) を構築していくのではなく、共通基盤の中に EDC を組み込み、in-House (自らの手)で維持運用しながら、臨床試験に依存してカスタマイズして作り込む部分を極力最小化することを図っている。現在は、Vanderbilt 大学が開発したオープンソースの REDCap システムを導入し、基盤整備に着手し、評価しているところである。一部の臨床研究において、内部での利用評価を進めて、それに合わせた GCP 水準の SOP 体系の見直しと改訂も行った。

IV. 今後考えられる新たな課題

本研究では HBV を阻害するリード化合物が得られて最適化で一定の成功をみた後は、小動物による前臨床試験段階での検討へと進める。製薬企業への早期導出を前提に初期開発を進めるが、最も有望な化合物については Phase 1、或は Phase 2a を実施することを視野に入れた開発・研究を進める。臨床試験は申請者代表が属し、臨床試験実施体制を有する国立国際医療研究センター・臨床研究センター、及び開発医療部や山梨大学病院（榎本）等を中心に進める。全期間中、本研究に属する有機化学合成担当者は、リード化合物の最適化を続けると共に、最新の構造学的情報に基づいた新規化合物のデザイン・合成を継続する。平成 25 年度までに、Hep2.2.15.7 を用いた抗 HBV 剤候補化合物のハイスループットスクリーニング (HTS) 法を構築、研究室の保持する核酸アナログライブラリー及び新規に合成された 150-170 個の化合物の中から優れた抗 HBV 活性を有する 15 の新規核酸アナログを開発・同定した。更に、小動物を用いた薬物動態・毒性の評価系を構築、種々の HBV 株を感染させたキメラマウスを作成、高度の抗 HBV 活性を示す化合物を投与し HBV 活性を検討した。平成 27 年度以降は、引き続き新規化合物の合成及びスクリーニング、薬剤評価系の更なる簡易化を継続して行い、より活性の高いリード化合物の同定を目指す。得られた薬剤候補化合物に関して既存の薬剤との交差耐性の有無を検討する。新規化合物設計における構造基盤を構築する為に、HBV 逆転写酵素の結晶を作成、構造解析を進める。併せて、前臨床・臨床試験実施の研究体制を整える。具体的な実験計画を以下に示す。

【平成 27 年度】(1)リード化合物の抗 HBV 効果を詳細に検討、構造最適化を図る。高活性化化合物について genotype や薬剤耐性株に対する効果を検証、HBV 感染キメラマウスを用いて、*in vivo* での抗 HBV 活性を検証する（満屋、天野、鎌田、田中、青木）。(2)浮遊細胞などを用いて、より簡便なスクリーニング法の開発を行う（児玉）。(3)新規ヌクレオシド誘導体の合成を行う（原口、向後、井本）。(4)哺乳細胞による発現サンプルを用いた研究、進化学による可溶性向上の試み、HIV RT への HBV 型変異の導入、の3点を柱として研究を遂行する（安武）。(5)Priming assay にて HBV pol 活性を測定する系を作製した。この測定系を用いて、哺乳類細胞から得た蛋白質が活性を持つことを確認した。来年度は、この活性測定系を用いて活性確認を行い、活性が得られた蛋白質を結晶化に供し、良質な結晶が得られたら構造解析を行う（尾曲）。(6)今回の検討で明らかとなった B 型肝炎にハイリスク群である HBs 抗原量低値、かつ HBcr 抗原量高値症例の臨床的特徴を更に明らかにすると共に、この様なハイリスク群の分子基盤についても検討を加える（榎本）。(7)候補化合物の放射ラベル体を合成、体内動態特性を決定する。ADME に関与する代謝酵素やトランスポーターを探索する。小動物を用いた評価系による有望化合物の急性毒性実験を進める（小田切）。(8)臨床試験の実施を指向し、標準業務手順書 (SOP) の作成やマニュアルの整備を進める（伊藤、田中）。

【平成 28 年度】(1)候補化合物での臨床試験プロトコルを作成、実施を準備する。三次元構造を基にした候補化合物の更なる最適化を行う。(2)4'-チオリボヌクレオシド等を合成する。(3)HBV-RT の結晶構造を基に、新規化合物の作用機序を明らかにする。薬剤耐性 RT の構造解析を行う。(4)B 型肝炎モデルマウスで体内動態解析を行う。PK-PD モデリングの構築を行う。(5)臨床試験データの妥当性を確認・実施する。(6)最適核酸塩基・糖および置換基を選択、最適化合物の大量合成ルートを確認する。(7)耐性変異 RT の結晶構造解析により耐性メカニズムを明らかにする。(8)霊長類等での動態特性・PK-PD モデリングを行い、至適血中濃度・投与量・投与経路を立案する。

V. 実用化(ワクチン、診断薬、治療薬の開発等)への貢献の可能性

本研究により開発・同定された抗 HBV 活性を有する新規化合物に関しては、本研究班の分担研究員である合成化学者らにより構造最適化を行うことで、その抗 HBV 活性および細胞毒性を向上させ、更に生体投与時の動態特性・PK-PD モデリングを行うことにより、前臨床・臨床試験にスムーズに移行でき、実用化へ貢献する可能性が十分あるといえる。また、これまでに明らかとなっていない HBV RT に関して結晶構造解析を進めており、今後 HBV RT の詳細な構造に基づいた薬剤設計が可能となると考えられる。また、RT 以外のウイルス側因子に関しても *in silico* docking simulation 法を用いた阻害剤の検索を行っており、これまでにない機序を有する抗 HBV 剤の開発につながる可能性がある。

VI. 行政施策への貢献の可能性

近年に至り、C 型肝炎ウイルス(HCV)肝炎の治療は長足の進歩を遂げ、現在開発中の抗 HCV 薬が臨床導入されると、殆どの HCV 感染者で「治癒」が得られると期待される。しかし、HBV に対する新規の治療薬の開発は遅々として進まず、HBV を体内から除去するという意味での「治癒」をもたらす治療法は極めて困難とされており、また現在使用されている治療薬に対しても耐性を獲得した HBV 変異株の出現が大きく懸念される。本研究でこれ迄より強力で HBV の耐性獲得に抵抗する新規の治療薬の開発が成功すれば、現在日本国内に約 150 万人生存すると推定される HBV 保有者に大きく裨益すると思われる。そうした保有者の 5%が慢性肝炎、肝硬変、肝細胞癌を発症するとされるので、QOL のみならず救命も可能となり、国民衛生に大きく資する事となると期待される。また本研究では HBV-RT の活性部位の微細構造の解明をも併せて行い、HBV の生物学を明らかにする事で、HBV の更に効果的な制御をも視野に入れており、他のウイルス感染症の制御の方途を探る上でも貢献するものと期待される。また本研究ではキメラマウスを用いた B 型肝炎モデルを作製する事で、HBV 変異株に対する新規薬剤の作用の観察が可能となることで新規治療薬の開発のタイムスケールの大幅短縮が期待され、将来の HBV の新規の治療薬開発にも大きく貢献すると強く期待される。

VII. 本研究の成果(発表論文・ガイドライン・マニュアル等)

※本研究費において行った研究に対するもののみを記載してください。

※研究代表者、研究分担者、研究協力者ごとに、発表論文名・学協会誌名・発表年(西暦)、
知的財産権の取得及び申請状況、ガイドライン名・作成主体・策定年月日等を記載して下さい。

※執筆者全員を明記し、当該研究者名に下線を引いてください。

(1) 満屋 裕明 (研究代表者) (平成 26 年度)

1. ○Yuki Takamatsu, Yasuhito Tanaka, Satoru Kohgo, Shuko Murakami, Kamendra Singh, Debananda Das, David J. Venzon, Masayuki Amano, Nobuyo Kuwata, Manabu Aoki, Nicole S. Delino, Sanae Hayashi, Satoru Takahashi, Kazuhiro Haraguchi, Stefan G. Sarafianos, Kenji Maeda, and Hiroaki Mitsuya. 4'-Modified Nucleoside Analogs: Potent Inhibitors Active against Entecavir-resistant HBV. Under submission.
2. ○Yuki Takamatsu, Yasuhito Tanaka, Satoru Kohgo, Shuko Murakami, Kamendra Singh, Debananda Das, David J. Venzon, Masayuki Amano, Nobuyo Kuwata, Manabu Aoki, Nicole S. Delino, Sanae Hayashi, Satoru Takahashi, Kazuhiro Haraguchi, Stefan G. Sarafianos, Kenji Maeda, and Hiroaki Mitsuya. 4'-MODIFIED NUCLEOSIDE ANALOGS: Potent Inhibitors Active against Entecavir-resistant Hepatitis B Virus (HBV_{ETV-R}^{L180M/S202G/M204V}). 54th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. September 5 -9, 2014. Washington, DC. Poster H-996.

小田切 優樹 (研究分担者) (平成 26 年度、英文論文のみ)

1. ○Tanaka R, Ishima Y, Maeda H, Kodama A, Nagao S, Watanabe H, Chuang VT, Otagiri M, Maruyama T. Albumin fusion prolongs the antioxidant and anti-inflammatory activities of thioredoxin in mice with acetaminophen-induced hepatitis. *Mol Pharm*. 11:1228-1238. (2014)
2. Kouno Y, Anraku M, Yamasaki K, Okayama Y, Iohara D, Ishima Y, Maruyama T, Kragh-Hansen U, Hirayama F, Otagiri M. N-acetyl-L-methionine is a superior protectant of human serum albumin against photo-oxidation and reactive oxygen species compared to N-acetyl-L-tryptophan. *Biochim Biophys Acta*. 1840:2806-2812. (2014)
3. Nagao S, Taguchi K, Sakai H, Tanaka R, Horinouchi H, Watanabe H, Kobayashi K, Otagiri M, Maruyama T. Carbon monoxide-bound hemoglobin-vesicles for the treatment of bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Biomaterials*. 35:6553-6562. (2014)
4. Ishima Y, Fang J, Kragh-Hansen U, Yin H, Liao L, Katayama N, Watanabe H, Kai T, Suenaga A, Maeda H, Otagiri M, Maruyama T. Tuning of poly-S-nitrosated human serum albumin as superior antitumor nanomedicine. *J Pharm Sci*. 103:2184-2188. (2014)
5. ○Ogaki S, Taguchi K, Watanabe H, Ishima Y, Otagiri M, Maruyama T. Carbon monoxide-bound red blood cell resuscitation ameliorates hepatic injury induced by massive hemorrhage and red blood cell resuscitation via hepatic cytochrome P450 protection in hemorrhagic shock rats. *J Pharm Sci*. 103:2199-2206. (2014)
6. Anraku M, Hiraga A, Iohara D, Uekama K, Tomida H, Otagiri M, Hirayama F. Preparation and antioxidant activity of PEGylated chitosans with different particle sizes. *Int J Biol Macromol*. 70:64-9. (2014)
7. Anraku M, Tanaka M, Hiraga A, Nagumo K, Imafuku T, Maezaki Y, Iohara D, Uekama K, Watanabe H, Hirayama F, Maruyama T, Otagiri M. Effects of chitosan on oxidative stress and related factors in hemodialysis patients.

Carbohydr Polym. 112:152-7. (2014)

8. Miyazaki Y, Taguchi K, Sou K, Watanabe H, Ishima Y, Miyakawa T, Mitsuya H, Fukagawa M, **Otagiri M**, Maruyama T. Therapeutic impact of erythropoietin-encapsulated liposomes targeted to bone marrow on renal anemia. *Mol Pharm.* 11:4238-48. (2014)
9. Otaguchi K, Chuang VTG, Yamasaki K, Urata Y, Tanaka R, Anraku M, Seo H, Kawai K, Maruyama T, Komatsu T, **Otagiri M**. Cross-linked human serum albumin dimer has the potential for use as a plasma retaining-agent for the fatty acid-conjugated antidiabetic drugs. *J Pharm Pharmacol.* in press
10. OMaeda H, Hirata K, Watanabe H, Ishima Y, Chuang VT, Taguchi K, Inatsu A, Kinoshita M, Tanaka M, Sasaki Y, **Otagiri M**, Maruyama T. Polythiol-containing, recombinant mannosylated-albumin is a superior CD68+/CD206+ Kupffer cell-targeted nano-antioxidant for the treatment of two acute hepatitis models. *J Pharmacol Exp Ther.* in press
11. Tanaka R, Ishima Y, Enoki Y, Kimachi K, Shirai T, Watanabe H, Chuang VT, Maruyama T, **Otagiri M**. Therapeutic Impact of Human Serum Albumin-Thioredoxin Fusion Protein on Influenza Virus-Induced Lung Injury Mice. *Front Immunol.* in press
12. Watanabe H, Miyamoto Y, Enoki Y, Ishima Y, Kadowaki D, Kotani S, Nakajima M, Tanaka M, Matsushita K, Mori Y, Kakuta T, Fukagawa M, **Otagiri M**, Maruyama T. p-Cresyl sulfate, a uremic toxin, causes vascular endothelial and smooth muscle cell damages by inducing oxidative stress. *Pharmacology Research & Perspectives* 3: e00092. (2015)

榎本 信幸 (研究分担者) (平成 26 年度、英文論文のみ)

1. Tatsumi A, Maekawa S, Sato M, Komatsu N, Miura M, Amemiya F, Nakayama Y, Inoue T, Sakamoto M, **Enomoto N**. Liver stiffness measurement for risk assessment of hepatocellular carcinoma. *Hepatol Res.* 2014 Jun 24.
2. Miura M, Maekawa S, Sato M, Komatsu N, Tatsumi A, Takano S, Amemiya F, Nakayama Y, Inoue T, Sakamoto M, **Enomoto N**. Deep sequencing analysis of variants resistant to the non-structural 5A inhibitor daclatasvir in patients with genotype 1b hepatitis C virus infection. *Hepatol Res.* 2014 Feb 25.
3. Komatsu N, Motosugi U, Maekawa S, Shindo K, Sakamoto M, Sato M, Tatsumi A, Miura M, Amemiya F, Nakayama Y, Inoue T, Fukasawa M, Uetake T, Ohtaka M, Sato T, Asahina Y, Kurosaki M, Izumi N, Ichikawa T, Araki T, **Enomoto N**. Hepatocellular carcinoma risk assessment using gadoxetic acid-enhanced hepatocyte phase magnetic resonance imaging. *Hepatol Res.* 2014 Dec;44(13):1339-1346.
4. Matsuura K, Tanaka Y, Watanabe T, Fujiwara K, Orito E, Kurosaki M, Izumi N, Sakamoto N, **Enomoto N**, Yatsushashi H, Kusakabe A, Shinkai N, Nojiri S, Joh T, Mizokami M. ITPA genetic variants influence efficacy of PEG-IFN/RBV therapy in older patients infected with HCV genotype 1 and favourable IL28B type. *J Viral Hepat.* 2014 Jul;21(7):466-74.
5. Yasui Y, Kudo A, Kurosaki M, Matsuda S, Muraoka M, Tamaki N, Suzuki S, Hosokawa T, Ueda K, Matsunaga K, Nakanishi H, Tsuchiya K, Itakura J, Takahashi Y, Tanaka S, Asahina Y, **Enomoto N**, Arii S, Izumi N. Reduced organic anion transporter expression is a risk factor for hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis C patients: a propensity score matching study. *Oncology.* 2014;86(1):53-62.
6. Maekawa S, **Enomoto N**. Once-daily simeprevir in combination with pegylated-interferon and ribavirin: a new

horizon in the era of direct-acting antiviral agent therapy for chronic hepatitis C. *J Gastroenterol.* 2014 Jan;49(1):163-4.

原口 一広 (研究分担者) (平成 26 年度、英文論文のみ)

1. Duraffour, S.; Drillien, R.; **Haraguch, K.** Balzarini, J.; van den Oord, J. J.; Andrei, G.; Snoeck, R. “KAY-2-41, a novel nucleoside analogue inhibitor of orthopoxviruses in vitro and in vivo”, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **2014**, *58*, 27-37.
2. Coen, N.; Duraffour, S; **Haraguch, K.**; Van den Oord, J. J.; Balzarini, J.; Snoeck, R. ; Andrei, G. “Unique spectrum of anti-herpesvirus activity and potent *in vitro* and *in vivo* efficacy against Epstein-Barr virus mediated by 4'-thiothymidine analogs”, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **2014**, *58*, 4328-4340.
3. Shimada, H.; **Haraguchi, K.**; Hotta, K.; Miyaike, T.; Kitagawa, Y.; Tanaka, H.; Kaneda, R.; Abe, H.; Shuto, S.; Mori, K.; Ueda, Y.; Kato, N.; Snoeck, R.; Andrei, G.; Balzarini, Y. “Synthesis of 3',4'-difluoro-3'-deoxyribonucleosides and its evaluation of the biological activities: Discovery of a novel type of anti-HCV agent 30,40-difluorocordycepin”, *Bioorg. Med. Chem.*, **2014**, *22*, 6174-6182.

児玉 栄一 (研究分担者) (平成 26 年度、英文論文のみ)

1. ○Kenji Maeda, Darshan V Desai, Manabu Aoki, Hiroto Nakata, **Eiichi N Kodama**, Hiroaki Mitsuya. Delayed emergence of HIV-1 variants resistant to 4'-ethynyl-2-fluoro-2'-deoxyadenosine: comparative sequential passage study with lamivudine, tenofovir, emtricitabine and BMS-986001. *Antiviral Therapy* 19:179-189, 2014.
2. ○Eleftherios Michailidis, Andrew D. Huber, Emily M. Ryan, Yee T. Ong, Maxwell D. Leslie, Kayla B. Matzek, Kamalendra Singh, Bruno Marchand, Ariel N. Hagedorn, Karen A. Kirby, Lisa C. Rohan, **Eiichi N. Kodama**, Hiroaki Mitsuya, Michael A. Parniak, and Stefan G. Sarafianos. 4'-ethynyl-2-fluoro-2'-deoxyadenosine (EFdA) inhibits HIV-1 reverse transcriptase with multiple mechanisms. *Journal of Biological Chemistry* 289:24533-24548, 2014
3. Shigeyoshi Fujiwara , Hiroshi Kimura, Ken-ichi Imadome, Ayako Arai, **Eiichi Kodama**, Tomohiro Morio, Norio Shimizu, Hiroshi Wakiguchi. Current Studies on Chronic Active Epstein-Barr virus Infection in Japan. *Pediatrics International*, **54**: 159-166, 2014

田中 靖人, 尾曲 克己 (研究分担者) (平成 26 年度、英文論文のみ)

1. ○Nakano N, Kusumoto S, **Tanaka Y**, Ishida T, Takeuchi S, Takatsuka Y, Akinaga S, Mizokami M, Ueda R, Utsunomiya A. Reactivation of hepatitis B virus in a patient with adult T-cell leukemia-lymphoma receiving the anti-CC chemokine receptor 4 antibody mogamulizumab. *Hepato Res.* 2014;44(3):354-7.
2. Shimada N, Tsubota A, Atsukawa M, Abe H, Ika M, Kato K, Sato Y, Kondo C, Sakamoto C, **Tanaka Y**, Aizawa Y. α -Fetoprotein is a surrogate marker for predicting treatment failure in telaprevir-based triple combination therapy for genotype 1b chronic hepatitis C Japanese patients with the IL28B minor genotype. *J Med Virol.* 2014;86(3):461-72.
3. Ocho M, Togayachi A, Iio E, Kaji H, Kuno A, Sogabe M, Korenaga M, Gotoh M, **Tanaka Y**, Ikehara Y, Mizokami M, Narimatsu H. Application of a glycoproteomics-based biomarker development method: alteration in glycan structure on colony stimulating factor 1 receptor as a possible glycobiomarker candidate for evaluation of liver cirrhosis. *J*

Proteome Res. 2014;13(3):1428-37.

4. O Watashi K, Sluder A, Daito T, Matsunaga S, Ryo A, Nagamori S, Iwamoto M, Nakajima S, Tsukuda S, Borroto-Esoda K, Sugiyama M, **Tanaka Y**, Kanai Y, Kusuhara H, Mizokami M, Wakita T. Cyclosporin A and its analogs inhibit hepatitis B virus entry into cultured hepatocytes through targeting a membrane transporter, sodium taurocholate cotransporting polypeptide (NTCP). *Hepatology*. 2014;59(5):1726-37.
5. Ragheb MM, Nemr NA, Kishk RM, Mandour MF, Abdou MM, Matsuura K, Watanabe T, **Tanaka Y**. Strong prediction of virological response to combination therapy by IL28B gene variants rs12979860 and rs8099917 in chronic hepatitis C genotype 4. *Liver Int*. 2014;34(6):890-5.
6. Matsuura K, **Tanaka Y**, Watanabe T, Fujiwara K, Orito E, Kurosaki M, Izumi N, Sakamoto N, Enomoto N, Yatsushashi H, Kusakabe A, Shinkai N, Nojiri S, Joh T, Mizokami M. ITPA genetic variants influence efficacy of PEG-IFN/RBV therapy in older patients infected with HCV genotype 1 and favourable IL28B type. *J Viral Hepat*. 2014;21(7):466-74.
7. Zheng LS, Hitoshi S, Kaneko N, Takao K, Miyakawa T, **Tanaka Y**, Xia H, Kalinke U, Kudo K, Kanba S, Ikenaka K, Sawamoto K. Mechanisms for interferon- α -induced depression and neural stem cell dysfunction. *Stem Cell Reports*. 2014;3(1):73-84.
8. O Kusumoto S, **Tanaka Y**, Mizokami M, Ueda R. Strategy for preventing hepatitis B reactivation in patients with resolved hepatitis B virus infection after rituximab-containing chemotherapy. *Hepatology*. 2014 ;60(2):765-6.
9. O Wong DK, Kopaniszen M, **Omagari K**, **Tanaka Y**, Fong DY, Seto WK, Fung J, Huang FY, Zhang AY, Hung IF, Lai CL, Yuen MF. Effect of hepatitis B virus reverse transcriptase variations on entecavir treatment response. *J Infect Dis*. 2014;210(5):701-7.
10. Tajiri H, **Tanaka Y**, Takano T, Suzuki M, Abukawa D, Miyoshi Y, Shimizu T, Brooks S. Association of IL28B polymorphisms with virological response to peginterferon and ribavirin therapy in children and adolescents with chronic hepatitis C. *Hepato Res*. 2014;44(10):E38-E44.
11. Matsuura K, Watanabe T, Iijima S, Murakami S, Fujiwara K, Orito E, Iio E, Endo M, Kusakabe A, Shinkai N, Miyaki T, Nojiri S, Joh T, **Tanaka Y**. Serum interferon-gamma-inducible protein-10 concentrations and IL28B genotype associated with responses to pegylated interferon plus ribavirin with and without telaprevir for chronic hepatitis C. *Hepato Res*. 2014;44(12):1208-1216.
12. Oda K, Uto H, Kumagai K, Ido A, Kusumoto K, Shimoda K, Hayashi K, Stuver SO, **Tanaka Y**, Nishida N, Tokunaga K, Tsubouchi H. Impact of a single nucleotide polymorphism upstream of the IL28B gene in patients positive for anti-HCV antibody in an HCV hyperendemic area in Japan. *J Med Virol*. 2014;86(11):1877-85.
13. Masaki N, Sugiyama M, Shimada N, **Tanaka Y**, Nakamuta M, Izumi N, Watanabe S, Tsubota A, Komatsu M, Masaki T, Enomoto N, Yoneda M, Murata K, Ito K, Koike K, Mizokami M. Pretreatment prediction of the outcome of response-guided peginterferon- α and ribavirin therapy for chronic hepatitis C. *J Gastroenterol Hepatol*. 2014;29(12):1996-2005.
14. O Nagamoto Y, Takayama K, Tashiro K, Tateno C, Sakurai F, Tachibana M, Kawabata K, Ikeda K, **Tanaka Y**, Mizuguchi H. Efficient engraftment of human iPS cell-derived hepatocyte-like cells in uPA/SCID mice by overexpression of FNK, a Bcl-x(L) mutant gene. *Cell Transplant*. 2014 in press.
15. O Isogawa M, **Tanaka Y**. The Immunobiology of Hepatitis B Virus Infection. *Hepato Res*. 2014 in press.