

地球規模課題対応国際科学技術協力

(感染症研究分野「開発途上国のニーズを踏まえた感染症対策研究」領域)

抗 C 型肝炎ウイルス(HCV)物質の同定及び HCV ならびにデングワクチ ンの開発

(インドネシア)

平成 24 年度実施報告書

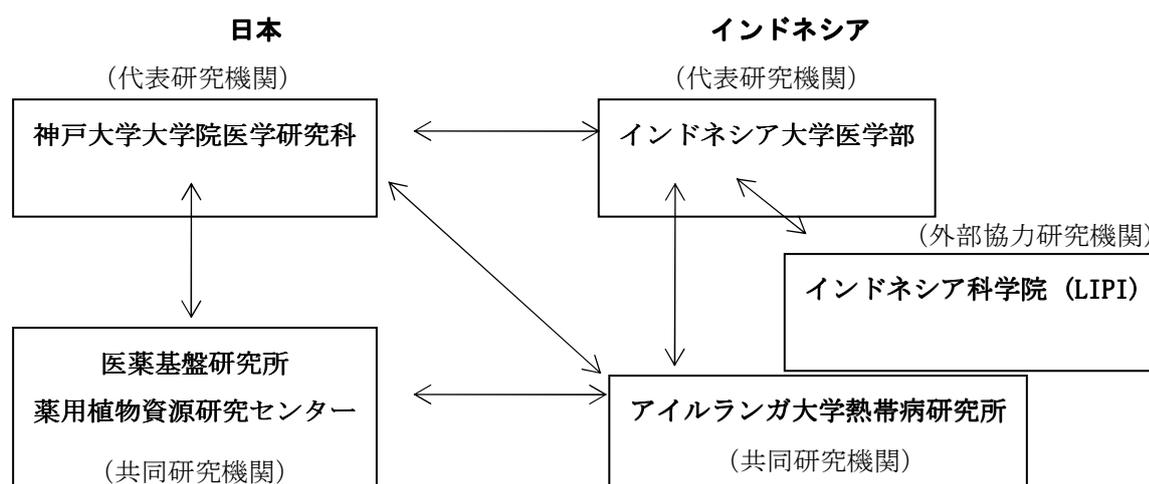
代表者：堀田 博

神戸大学 大学院医学研究科・教授

<平成 21 年度採択>

1. プロジェクト全体の実施の概要

本研究の日本側代表研究機関は神戸大学大学院医学研究科であり、共同研究機関として医薬基盤研究所薬用植物資源研究センターが参加している。インドネシア側代表研究機関はインドネシア大学医学部であり、共同研究機関としてアイルランガ大学熱帯病研究所が参加している。なお、外部協力研究機関としてインドネシア科学院 (LIPI) とも連携している。



本プロジェクトでは次の 4 項目について研究を実施している。(1)インドネシア特有および日本原産の薬用植物資源・天然抽出物等を用いてC型肝炎ウイルス(HCV)に対する抗ウイルス活性のスクリーニング、抗ウイルス物質の同定と作用機序の解析を行う。インドネシアの薬用植物資源等については、インドネシア大学及びインドネシア科学院 (LIPI) と共同でサンプルを得て、インドネシア大学において抗 HCV 活性を調べ、抗 HCV 活性を有する薬用植物粗抽出物を同定する。それをさらに分画し、抗 HCV 活性を有する化合物を同定する。アイルランガ大学においても、現地の研究室を整備し、同様の研究を行う。また、我が国においては、医薬基盤研究所薬用植物資源研究センターで収集した薬用植物等の抗 HCV 活性を神戸大学において探索し、抗 HCV 活性を有する化合物を同定する。(2)デングウイルス 1 型～4 型に対するDNAワクチン候補の作製と動物実験レベルの開発研究を、インドネシア大学及び神戸大学において共同で行う。現地の研究室を整備し、ウイルス分離及びワクチン開発の研究を効率良く行えるようにする。そして、インドネシアで分離したデングウイルス 1 型～4 型それぞれの prM+E 遺伝子領域のクローニングを行い、DNAワクチン用のプラスミドに組込んで、1 型～4 型の 4 種類のワクチン候補を作製する。(3)HCV タンパク質発現組換え水痘生ワクチン候補株を作製するために、細胞性免疫を効率良く誘導する HCV 遺伝子領域、及び中和抗体産生を効率良く誘導する HCV 遺伝子領域を同定する。そして、それらの HCV 遺伝子領域を発現する組換え水痘生ワクチン候補株を作製し、その生ワクチン候補株の免疫誘導能について検討する。(4)これらの共同研究及びインドネシア人若手研究者の日本への招へいと日本人若手研究者のインドネシアへの派遣を通して、インドネシア及びわが国における研究技術の向上や人材育成を行う。なお、インドネシアとの共同研究の期間は平成 22 年 2 月から平成 26 年 2 月までの 4 年間である。

2. 研究グループ別の実施内容

2.1. 抗 HCV 物質研究開発グループ

①研究のねらい

HCV 慢性感染者は我が国で約 200 万人、インドネシアで 700 万人以上、全世界で約 1 億 7,000 万人と推定されている。そして、毎年、日本で約 2 万 7,000 人が HCV による原発性肝がんで、また、約 1 万 2,000 人が HCV による肝硬変で死亡している。すなわち、日本では毎年約 4 万人が、HCV 感染が直接原因となって死亡している。また、インドネシアでは毎年 20 万人以上が、HCV 感染が直接原因となって死亡していると推定される。現在臨床で用いられている抗 HCV 治療法では、半数近い症例で完全治癒が望めず、新規の抗 HCV 薬を含む治療法の開発・改良が強く求められている。

抗 HCV 物質研究開発グループでは、インドネシア特有および日本原産の薬用植物資源・天然抽出物等を用いて、HCV に対する抗ウイルス薬のスクリーニングと作用機序の解析を行う。抗 HCV 薬の開発は、多くの HCV 慢性感染者にとって大きな福音になるとともに、感染症対策に資する研究者の人材育成を通じた研究基盤の確立及び新産業の創出につながることを期待される。

②研究実施方法

医薬基盤研究所薬用植物資源研究センターにおいて、すでに収集・保有している薬用植物に加えて新たな試料から、メタノール加温抽出法を用いて抽出液を作製し、乾燥により粗抽出標品を調整する。

神戸大学においてそれらの標品を DMSO に溶解し、その溶解液を用いて HCV に対して抗ウイルス効果を有する物質のスクリーニングを実施する。具体的な手順として、まず、上記薬用植物抽出液とウイルス液を混合して培養細胞に感染させ、さらにウイルス吸着後も感染細胞に薬用植物抽出液を加えて培養し、ウイルス増殖の阻害効果の有無を検討する。ウイルス増殖阻害効果を示す薬用植物抽出液が見つかれば、その薬剤処理のタイミングをウイルス吸着前と後の2通りに分け、ウイルス吸着阻害効果あるいは吸着以降のウイルス増殖過程における阻害効果の有無を検討する。

医薬基盤研薬用植物資源研究センターでは、上記アッセイ法において効果が認められた植物メタノール抽出エキスについて、さらに各種有機溶媒にて分配を行い、それぞれの分画についてアッセイを行う。ここで効果が見られた分画はさらに各種クロマトグラフィーによりさらに精製を進めていく。最終的に単離された化合物については、核磁気共鳴スペクトルなどにより化学構造の解明を行っていく。

インドネシア大学において、バイオセーフティーレベル(BSL)2 実験室の設置を完成させ、まず HCV の培養を開始する。そして順次、抗ウイルス薬スクリーニングの研究基盤の構築を進める。そして、インドネシア大学及びインドネシア科学院(LIPI)と共同で入手した薬用植物抽出液について、神戸大学で実施しているスクリーニング法を用いて、HCV に対する抗ウイルス活性を測定する。スクリーニング陽性のサンプルから、上記の分画方法を用いて、抗 HCV 活性を有する化合物を単離・同定する。

アイルランガ大学においては、HCV の培養と抗ウイルス薬スクリーニングの研究基盤の構築がまだ十分でないため、まず、BSL2 実験室の設置等、研究基盤の構築を開始する。さらに薬用植物由来の抗ウイルス物質を単離・同定する研究基盤を構築し、インドネシア大学と同様に、薬用植物抽出液等由来の抗 HCV 活性を有する化合物を単離・同定する。

③当初の計画(全体計画)に対する現在の進捗状況

医薬基盤研究所薬用植物資源研究センターにおいて、同センターが保有する国内産薬用植物から粗抽出物を作製し、神戸大学において、HCV に対する抗ウイルス効果を有する物質のスクリーニングを行

った。その結果、抗 HCV 作用を有する数種類の薬用植物エキスを見出し、それらの活性成分の精製分離を行なった。その結果、既に他の研究グループにより抗ウイルス活性が報告されているものを含めて、抗 HCV 活性を有する複数種類の化合物を同定した。それらの化合物の作用機序や類縁化合物について、さらに解析を進めている。また、一部のインドネシア産薬用植物の分離精製に関しては、昨年引き続きインドネシア人研修生が来日して医薬基盤研究所薬用植物資源研究センターにおいて技術指導を受けながら精製分離と同定を担当し、神戸大学で別のインドネシア人研修生により抗 HCV 活性を測定した。

インドネシア大学においては、インドネシア科学院 (LIPI) の協力を得て、日本人常駐研究者とインドネシア人共同研究者により、インドネシア産薬用植物エキスの抗 HCV 活性のスクリーニングと、活性を有する化合物の単離・同定を行った。その結果、既に他の研究グループにより抗ウイルス活性が報告されているものを含めて、上記の日本で同定されたものとは異なる抗 HCV 活性を有する複数種類の化合物を同定した。また、抗ウイルス活性とは正反対の活性であるが、HCV 粒子産生を亢進させる天然物由来の分画や化合物を同定した。さらに、薬用植物の分取・分析のための機器 (遠心エバポレーター、高速液体クロマトグラフィー等) の機器設置を行い、研究に必要な基盤を整備した。

アイルランガ大学においては、P2 安全キャビネット等の主要な抗 HCV 活性スクリーニング用機器一式、高速液体クロマトグラフィー、NMR 実験装置等の設置を行い、研究に必要な基盤を整備し、本格的に研究を行った。その結果、抗 HCV 活性を有する複数種類の化合物を同定した。

④カウンターパートへの技術移転の状況 (日本側および相手国側と相互に交換された技術情報を含む)

インドネシア大学及びアイルランガ大学における BSL2 実験室の設置と遺伝子組換え実験の承認手続きを完了した。また、インドネシアの薬用植物・天然物由来物質の分与 (共同使用) に関して、インドネシア大学医学部とインドネシア科学院 (LIPI) の間の合意書が近々締結される予定である。

インドネシア人研究者の日本における研修については、平成 22 年度に 3 名 (延数) をそれぞれ 3 ヶ月間、平成 23 年度に 2 名をそれぞれ 3 ヶ月間、平成 24 年度には 4 名をそれぞれ 3 ヶ月間、JICA 研修員として神戸大学及び医薬基盤研究所薬用植物資源研究センターに受け入れ、薬用植物エキスの抗ウイルス活性及び細胞障害活性のスクリーニング並びに生薬成分の分離精製技術、化合物の化学構造決定手法に関する技術移転を行っている。

⑤当初計画では想定されていなかった新たな展開があった場合、その内容と展開状況 (あれば)

インドネシア大学においては、当初、薬用植物の供給源としてインドネシア科学院 (LIPI) との共同研究を主体に計画していたが、インドネシア大学医学部にも研究遂行に必要な植物化学、分取・分析技術を導入し、自前の研究技術を確立することが今後の発展にとって重要であると考え、薬用植物の分取・分析及び単離した化合物同定のための機器設置を行い、研究に必要な基盤を整備した。その結果、薬理学講座を含む多数の研究者との新たな共同研究環境を構築することができた。

また、アイルランガ大学に NMR 実験装置を導入し、医薬基盤研究所薬用植物資源研究センターの協力を得て、インドネシアにおいて自前で単離化合物を同定し得る研究基盤を構築した。

一方、抗ウイルス活性とは正反対の活性であるが、HCV 粒子産生を亢進させる天然物由来の分画や化合物を同定した。このような研究成果は HCV 不活化全粒子ワクチンの産生を効率的に行うために有用であり、また、HCV の病原性発現を考える上でも有用な情報である。

2.2. HCV ワクチン研究開発グループ

①研究のねらい

前述の通り、HCV 慢性感染者は我が国で約 200 万人、インドネシアで 700 万人以上、全世界で約 1 億 7,000 万人と推定されている。そして、毎年、日本で約 2 万 7,000 人が HCV による原発性肝がんで、また、約 1 万 2,000 人が HCV による肝硬変で死亡している。すなわち、日本では毎年約 4 万人が、HCV 感染が直接原因となって死亡している。また、インドネシアでは毎年 20 万人以上が、HCV 感染が直接原因となって死亡していると推定される。現在臨床で用いられている抗 HCV 治療法では、半数近い症例で完全治癒が望めず、HCV 治療ワクチンを含む新規治療法の開発が強く求められている。また、インドネシアにおいては輸血以外のルートで新たな HCV 感染者が発生していると推定されており、ワクチンによる新たな感染防止対策の確立も求められている。

HCV ワクチン研究開発グループでは、HCV のエンベロープタンパク質及び非構造タンパク質の一部を発現する DNA ワクチン及びこれを基にした組換え水痘生ワクチンを作製し、動物実験により中和抗体や細胞性免疫、感染防御能の誘導等、ワクチン効果について検討する。HCV に対する治療ワクチンの開発は多くの HCV 慢性感染者にとって大きな福音になり、予防ワクチンの開発は今後の新たな感染者発生の防止に役立つとともに、感染症対策に資する研究者の人材育成を通じた研究基盤の確立及び新産業の創出につながることを期待される。

②研究実施方法

神戸大学において、HCV のエンベロープタンパク質及び非構造タンパク質 NS3 をコードする遺伝子領域を PCR 法により増幅し、その DNA 断片を哺乳動物細胞発現ベクターに組み込んだ発現プラスミドを作製する。そして、これらの発現プラスミドを培養細胞に導入し、個々の HCV タンパク質に特異的な抗体を用いたウエスタンブロット法により、それぞれの HCV タンパク質が予想通り発現されていることを確認する。

これらの発現プラスミドを用いて HCV タンパク質を培養細胞に発現させ、この発現細胞または発現プラスミドそのものをマウスに接種して、抗体産生及び細胞性免疫の誘導を指標に抗 HCV 免疫応答を調べる。最も効果的に免疫応答を誘導できる HCV 遺伝子領域を、下記の水痘ワクチンゲノムに挿入することとする。

HCV 遺伝子領域を水痘ワクチンゲノムに挿入するために、まず水痘ワクチン株ゲノム内において外来遺伝子挿入可能箇所を探索する。その結果に基づいて、水痘ワクチンゲノム内の ORF2、ORF3 間に HCV 遺伝子領域を挿入する。そして、作製された HCV タンパク質発現組換え水痘ワクチンの免疫誘導効果について調べる。

③当初の計画(全体計画)に対する現在の進捗状況

神戸大学において、HCV のエンベロープタンパク質及び非構造タンパク質の一部をコードする遺伝子領域を組み込んだ発現プラスミドを数種類作製した。平成 24 年度はとくに、HCV 非構造タンパク質 NS3 のプロテアーゼ活性とヘリカーゼ活性を共に消失させることによって発がん性など人(宿主細胞)への悪影響を可及的に低下させた NS3 を発現するプラスミドを作製し、マウスに筋肉内接種することにより、NS3 に対する細胞性免疫誘導活性(インターフェロン γ 産生誘導活性、MHC クラス II 拘束性細胞傷害活性)について検討した。その結果、NS3 のプロテアーゼ活性とヘリカーゼ活性を共に消失させ、しかも野生型 NS3 と同等な細胞性免疫誘導活性を保持する NS3 発現プラスミド(DNA ワクチン)の作製に成功した。現在、この新規の変異型 NS3 タンパク質を発現する組換え水痘ワクチンの作製を進めている。

また、関連研究として、NS3(野生型)を発現する遺伝子組換え乳酸菌を作製し、これを経口生ワクチンとしてマウスに投与することにより、NS3 に対する細胞性免疫(インターフェロン γ 産生)を誘導できることを明らかにした。

④カウンターパートへの技術移転の状況(日本側および相手国側と相互に交換された技術情報を含む)

平成 22 年 10 月 1 日から、インドネシア人若手研究者 2 名及び平成 23 年 10 月 1 日から、1 名を文部科学省国費留学生として招へいし、ワクチン学及びウイルス学の勉学の機会を提供している。(平成 26 年 3 月までの 3 年半及び平成 27 年 10 月までの 4 年間)

⑤当初計画では想定されていなかった新たな展開があった場合、その内容と展開状況(あれば)なし。

2.3. デング DNA ワクチン研究開発グループ

①研究のねらい

インドネシアにおいてはアジア地域の他の発展途上国と同様に、デング熱/デング出血熱が蔓延しており、保健衛生上、大きな問題になっている。毎年、10 万人以上の確定症例と 1,000 人以上の死者が報告されている。一方、航空機網の発達によりアジア諸国と我が国は数時間以内の往来で結ばれており、デング熱/デング出血熱の流行は、リアルタイムで我が国の問題でもある。しかし、認可されたワクチンは未だ開発されていないため、その開発研究が強く求められている。

デング DNA ワクチン研究開発グループでは、インドネシアで流行するデングウイルス株を用いて、有効なデング 4 価 DNA ワクチンの作製と評価を行う。予防ワクチンの開発は、インドネシアにとっても世界の流行国にとっても大きな福音になるとともに、開発途上国における感染症対策に資する研究者の人材育成を通じた研究基盤の確立及び新産業の創出につながる事が期待される。

②研究実施方法

神戸大学において、プロトタイプとされているこれまでのデングウイルス分離株のエンベロープタンパク質(prM+E)をコードする遺伝子領域を発現プラスミドに組み込み、DNA ワクチン候補株を作製する。これをマウスに接種し、抗デングウイルス中和抗体誘導能について調べる。

インドネシア大学において、デング流行時に採取した患者血液等の臨床検体からデングウイルスを分離する。デングウイルスの全ての血清型(1 型~4 型)のインドネシア流行株を分離し、prM/E 遺伝子領域の塩基配列を決定し、それらを発現プラスミドに組み込んで 4 種類の DNA ワクチン候補株を作製する。デングウイルス 1 型~4 型に対応する DNA ワクチンをマウスに接種し、デングウイルス 1 型~4 型に対する中和抗体の産生を指標にして、ワクチンの免疫誘導能について調べる。

インドネシア大学においては、ウイルス分離のための BSL2 実験室の設置やシーケンス解析等の研究基盤の構築がまだ十分ではないため、本プロジェクトのデングウイルス研究専用の BSL2 実験室を整備する。

③当初の計画(全体計画)に対する現在の進捗状況

神戸大学においてデング DNA ワクチン作製の戦略を構築し、免疫誘導に最も効果的な遺伝子群である prM シグナルーprM-E 領域をクローニングするためのプライマー設計を確立した。

インドネシアにおけるプロジェクトの実施のために、P2 安全キャビネットや高速遠心機などの機器類の設置により研究基盤の整備を行うとともに、遺伝子組換え実験の承認手続きを行った。

次いで、デングウイルス 1 型~4 型それぞれの遺伝子クローニングの戦略についてのノウハウを移転し

た。そして、インドネシア大学において、流行時の患者血清からデングウイルス1型～4型をすべて分離し、免疫誘導に最も効果的な遺伝子群である prM/E 領域をクローニングした。クローン化されたデングウイルス各型の prM/E 領域を、哺乳動物細胞発現用ベクターである pcDNA3 に組み込み、デングウイルス4種類(1型～4型)の血清型のインドネシア流行株に対する DNA ワクチンを構築した。また、それらの DNA 断片をヒト用ワクチンベクターである pUMVC4 に組み込み、ヒトに実用化が可能な DNA ワクチン候補を構築した。さらに、これら4種類の DNA ワクチンを単価ワクチンとしてマウスに接種した結果、いずれにも中和抗体誘導能が確認された。

④カウンターパートへの技術移転の状況(日本側および相手国側と相互に交換された技術情報を含む)

具体的な技術移転の第一段階として、デングウイルス中和抗体産生等の免疫誘導に最も効果的な遺伝子群である prM シグナルーprM-E 領域をクローニングするためのプライマー設計情報を、これまでの日本側における成果に基づいて、インドネシア側に伝えた。さらに、インドネシア大学におけるデングウイルス流行株の分離及びウイルス遺伝子のクローニング段階で発生した様々な問題点に対して、神戸大学から解決策を技術移転した。第二段階として、マウス実験の開始に伴い、実験動物の基本的取り扱い法、ワクチン接種法ならびに採血法などの実験技術と共に、倫理関係の規則などの情報も伝えた。また、ワクチン評価法として、中和抗体の誘導をプラーク数減少により調べる方法、そしてメモリーB細胞の誘導を2次免疫応答により調べる方法を伝授した。

平成22年10月から2ヶ月間、インドネシア大学医学部若手研究者1名をJICA研修員として神戸大学に受け入れ、DNAワクチンの開発研究に関する実技指導を行った。また、平成22年10月1日から、別のインドネシア人若手研究者1名を文部科学省国費留学生として招へいし、ワクチン学及びウイルス学の勉学の機会を提供している(平成26年3月まで)。さらに、平成25年1月に、3人目のインドネシア大学医学部若手研究者をJICA研修員として神戸大学に受け入れている(平成25年3月まで)。

⑤当初計画では想定されていなかった新たな展開があった場合、その内容と展開状況(あれば)
なし

3. 成果発表等

(1) 原著論文発表

- ① 本年度発表総数(国内 5件、国際 21件、“in press” 1件)
- ② 本プロジェクト期間累積件数(国内 11件、海外 41件)
- ③ 論文詳細情報

Konishi E, Sakai Y, Kitai Y, Yamanaka A. Prevalence of antibodies to Japanese encephalitis virus among inhabitants in Java Island, Indonesia, with a small pig population. *Am J Trop Med Hyg.* 80: 856-861, 2009.

Konishi E, Kitai Y. Detection by ELISA of antibodies to Japanese encephalitis virus nonstructural 1 protein induced in subclinically infected humans. *Vaccine.* 27: 7053-7058, 2009.

Konishi E. Status of natural infection with Japanese encephalitis virus in Japan: prevalence of antibodies to the nonstructural 1 protein among humans and horses. *Vaccine.* 27: 7129-7130, 2009.

Yamanaka A, Konishi E. A simple method for evaluating dengue vaccine effectiveness in mice based on levels of viremia caused by intraperitoneal injection of infected culture cells. *Vaccine*. 27: 3735–3743, 2009.

Yu L, Aoki C, Shimizu Y, Shimizu K, Hou W, Yagy F, Wen X, Oshima M, Iwamoto A, Gao B, Lin W, Gao GF, Kitamura Y. Development of a simple system for screening anti-hepatitis C virus drugs utilizing mutants capable of vigorous replication. *J Virol Methods* 69: 380–384, 2010.

Hayashida K, Shoji I, Deng L, Jiang D-P, Ide Y-H, Hotta H. 17 β -Estradiol inhibits the production of infectious particles of hepatitis C virus. *Microbiol Immunol*. 54(11): 684–690, 2010.

Sasayama M, Deng L, Kim SR, Ide Y-H, Shoji I, and Hotta H. Analysis of neutralizing antibodies against hepatitis C virus in patients who were treated with pegylated-Interferon plus ribavirin. *Kobe J Med Sci*. 56(2): E60–66, 2010.

Konishi E, Tabuchi Y, Yamanaka A. A simple assay system for infection-enhancing and -neutralizing antibodies to dengue type 2 virus using layers of semi-adherent K562 cells. *J Virol Methods*. 163: 360–367, 2010.

Kuwahara M, Konishi E. Evaluation of extracellular subviral particles of dengue virus type 2 and Japanese encephalitis virus produced by *Spodoptera frugiperda* cells for use as vaccine and diagnostic antigens. *Clin Vaccine Immunol*. 17: 1560–1566, 2010.

Yamamoto S, Wada J, Katayama T, Jikimoto T, Nakamura M, Kinoshita S, Lee K M, Kawabata M, Shirakawa T. Genetically modified *Bifidobacterium* displaying *Salmonella*-antigen protects mice from lethal challenge of *Salmonella Typhimurium* in a murine typhoid fever model. *Vaccine*, 28(41): 6684–6691, 2010.n

Deng L, Shoji I, Ogawa W, Kaneda S, Soga T, Jiang DP, Ide YH, Hotta H. Hepatitis C Virus Infection Promotes Hepatic Gluconeogenesis through an NS5A-Mediated, FoxO1-Dependent Pathway. *J Virol*, 45(17): 8556–8568, 2011.

El-Shamy A, Shoji I, Saito T, Watanabe H, Ide YH, Deng L, Kawata S, Hotta H. Sequence heterogeneity of NS5A and core proteins of hepatitis C virus and virological responses to pegylated-interferon/ribavirin combination therapy. *Microbiol Immunol*, 55(6): 418–426, 2011.

Konishi E, Miyagawa Y, Balance of infection-enhancing and neutralizing antibodies induced by a dengue tetravalent DNA vaccine in a mouse model. *Microbes Infect*, 13(12–13): 1091–1098, 2011.

Konishi E, Konishi M, Nonstructural protein 1 antibody-based epitope-blocking enzyme-linked immunosorbent assay to differentiate Japanese encephalitis virus from dengue virus infections in humans. *Jpn J Infect Dis*, 64(4): 284-291, 2011.

Kitai Y, Shirafuji H, Kanehira K, Kamio T, Kondo T, Konishi E, Specific antibody responses to West Nile virus infections in horses preimmunized with inactivated Japanese encephalitis vaccine: evaluation of blocking ELISA and complement-dependent cytotoxicity assay. *Vector Borne Zoonotic Dis*, 11(8): 1093-1098, 2011.

Kitai Y, Kondo T, Konishi E, Nonstructural protein 1 (NS1) antibody-based assays to differentiate West Nile (WN) virus from Japanese encephalitis virus infections in horses: effects of WN virus NS1 antibodies induced by inactivated WN vaccine. *J Virol Methods*. 171: 123-128, 2011.

Konishi E, Takizawa Y. Effect of pre-existing immunity to flaviviruses on balanced induction of neutralizing antibodies by a dengue tetravalent DNA vaccine in mice. *J Vaccin Vaccinat*. 1, 1000102, 2011. (DOI 10.4172/2157-7560.1000102)

Yamanaka A, Mulyatno KC, Susilowati H, Hendrianto E, Ginting AP, Sary DD, Rantam F A, Soegeng Soegijanto S, Konishi E. Displacement of the predominant dengue virus from type 2 to type 1 with a subsequent genotype shift from IV to I in Surabaya, Indonesia 2008-2010. *PLoS One*, 6(11): e27322, 2011.

Wichit S, Jittmittraphap A, Hidari KI, Thaisomboonsuk B, Petmitr S, Ubol S, Aoki C, Itonori S, Morita K, Suzuki T, Suzuki Y, Jampangern W. Dengue virus type 2 recognizes the carbohydrate moiety of neutral glycosphingolipids in mammalian and mosquito cells. *Microbiol Immunol*, 55(2): 135-140, 2011.

Wakana D, Kawahara N, Goda Y. Three new triterpenyl esters, codonopilates A-C, isolated from *Codonopsis pilosula*. *J Nat Med*, 65 (1): 18-23, 2011.

Amakura Y, Yoshimura M, Kawahara N, Goda Y, Yoshida T. TLC-based identification test for the crude drug “*Salviae miltiorrhizae Radix*” and “*Codonopsis Radix*”. *Jpn J Pharmacognosy*, 65(1): 18-24, 2011.

Kiuchi K, Goda Y, Isizaki M, Ito H, Kawasaki T, Kawahara N, Kanmoto T, Kikuchi Y, Kondo S, Sugimoto C, Narukawa Y, Higano T, Yamamoto Y. Crude drug identification tests with TLC in the Japanese pharmacopoeia (1) – Kanmoto T, Kikuchi Y, Kondo S, Sugimoto C, Narukawa Y, Higano T, *Jpn J Pharmacognosy*, 65 (1): 25-32, 2011.

Kawahara N. Recent progress of international harmonization of crude drugs and medicinal plants –Activity of FHH (The Western Pacific Regional Forum for the Harmonization of Herbal Medicines) –.

Yakugaku Zasshi, 130 (3): 383-393, 2011.

Sugimura K, Iida O, Fuchino H, Kawahara N, Watanabe T, Okada M, Tofu P, Pitisopa F, Koyama T. Plant inventory in the Solomon islands, with special reference to medicinal plant resources (2). Distribution of useful plant species in relation to habitat in Tetepare island, the Solomon islands. J Jpn Botany, 86 (1): 26-35, 2011.

Ishihara R, Takamatsu A, Norito M, Yamashita Y, Hashizume T, Kawahara N. Preparation and quality evaluation of laurolicsine from root of *Lindera strychnifolia fernandez-villar* (Lauraceae) as a standard reference material. Pharmaceutical Reg Sci, 42 (8): 714-722, 2011.

Yoshimatsu K, Kawano N, Kawahara N. Seed morphology and alkaloids in genus *Papaver*. Pharmaceutical Regulatory Science, 42 (1): 72-84, 2011.

Matsui C, Shoji I, Kaneda S, Sianipar IR, Deng L, Hotta H. Hepatitis C virus infection suppresses GLUT2 gene expression via down-regulation of hepatocyte nuclear factor 1 α . J Virol, 86(23): 12903-12911, 2012.

Shoji I, Deng L, Hotta H. Molecular mechanism of hepatitis C virus-induced glucose metabolic disorders. Front Microbiol, 2: A278, 1-5, 2012.

Kamada K, Shoji I, Deng L, Aoki C, Ratnoglik SL, Wakita T, Hotta H. Generation of a recombinant reporter hepatitis C virus useful for the analyses of virus entry, intra-cellular replication and virion production. Microbes Infect, 14(1): 69-78. 2012.

Sasayama M, Shoji I, Adianti M, Jiang D-P, Deng L, Saito T, Watanabe H, Kawata S, Aoki C, Hotta H. A point mutation at ASN-534 that disrupts a conserved N-glycosylation motif of the E2 glycoprotein of hepatitis c virus markedly enhances the sensitivity to antibody neutralization. J Med Virol, 84(2): 229-234, 2012.

El-Shamy A, Kim SR, Ide YH, Sasase N, Imoto S, Deng L, Shoji I, Hotta H. Polymorphisms of hepatitis C virus NS5A and core proteins and clinical outcome of pegylated Interferon/Ribavirin combination therapy. Intervirology, 55(1): 1-11, 2012.

El-Shamy A, Shoji I, El-Akel W, Bilasy SE, Deng L, El-Raziky M, Jiang DP, Esmat G, Hotta H. NS5A sequence heterogeneity of hepatitis C virus genotype 4a predicts clinical outcome of pegylated-interferon/ribavirin therapy in Egyptian patients. J Clin Microbiol, 50(12): 3886-3892, 2012.

El-Shamy A, Shoji I, Kim SR, Ide Y, Imoto S, Deng L, Yoon S, Fujisawa T, Tani S, Yano Y, Seo Y, Azuma T, Hotta H. Sequence heterogeneity in NS5A of hepatitis C virus genotypes 2a and 2b and clinical outcome of pegylated -interferon /ribavirin therapy. PLoS ONE, 7(2): e30513, 2012.

Kim SR, El-Shamy A, Imoto S, Kim KI, Ide YH, Deng L, Shoji I, Tanaka Y, Hasegawa Y, Ota M, Hotta H. Prediction of response to pegylated interferon/ribavirin combination therapy for chronic hepatitis C genotype 1b and high viral load. J Gastroenterol, 47(10): 1143–51, 2012.

Shimizu YK, Hijikata M, Oshima M, Shimizu K, Alter HJ, Purcell RH, Yoshikura H, Hotta H. Isolation of human monoclonal antibodies to the envelope E2 protein of hepatitis C virus and their characterization. PLoS ONE, 8(2):e55874, 2013.

El-Shamy A, Shindo M, Shoji I, Deng L, Okuno T, Hotta H. Polymorphisms of the core, NS3 and NS5A proteins of hepatitis C virus genotype 1b associate with development of hepatocellular carcinoma. Hepatology, (in press)

Mulyatno KC, Yamanaka A, Ngadino, Konishi E. Resistance of *Aedes aegypti laevae* to temephos insecticide in Surabaya, Indonesia. Southeast Asian J Trop Med Public Health. 43:29–33, 2012.

Mulyatno KC, Susilowati H, Yamanaka A, Soegijanto S, Konishi E. First isolation and phylogeny of Chikungunya virus from Surabaya, Indonesia. Jpn J Infect Dis, 65: 92–94, 2012.

Mulyatno KC, Yamanaka A, Yotopranoto S, Konishi E. Vertical transmission of dengue virus in *Aedes aegypti* collected in Surabaya, Indonesia, during 2008-2011. Jpn J Infect Dis. 65 (3), 274–276, 2012

Yamanaka A, Tabuchi Y, Mulyatno KC, Susilowati H, Hendrianto E, Soegijanto S, Konishi E. Dengue virus infection-enhancing and neutralizing antibody balance in children of the Philippines and Indonesia. Microbes Infect. 14(13): 1152–9, 2012

Yamaji H, Segawa M, Nakamura M, Katsuda T, Kuwahara M, Konishi E. Production of Japanese encephalitis virus-like particles using the baculovirus-insect cell system. J Biosci Bioeng. 114(6): 657–62, 2012

Konishi E, Kitai Y, Nishimura K, Harada S. Follow-up survey of Japanese encephalitis virus infection among humans in Kumamoto Prefecture, south-west Japan: status during 2009-2011. Jpn J Infect Dis. 65(5): 448–50, 2012

Sjatha F, Takizawa Y, Yamanaka A, Konishi E. Phylogenetic analysis of dengue virus types 1 and 3 isolated in Jakarta, Indonesia in 1988. Infect Genet Evol. 12(8): 1938–43, 2012

Kuwahara M, Kitai Y, Kondo T, Konishi E. Survey of antibodies specific for West Nile virus in horses from 2006 to 2010 in Japan. *Jpn J Infect Dis.* 65(6): 553-5, 2012

Yamaji H, Nakamura M, Kuwahara M, Takahashi Y, Katsuda T, Konishi E. Efficient production of Japanese encephalitis virus-like particles by recombinant lepidopteran insect cells. *Appl Microbiol Biotechnol*, 97(3): 1071-9, 2013

Fuchino H, Hishida A, Akagi K, Kiuchi F, Kawahara N. Quality evaluation of Crude Drugs Using LC-NMR/MS (1) in the Cultivation and Processing of *Achyranthes* Roots. *Jpn J Pharmacognosy*, 66 (1): 1-16, 2012.

Anjiki N, Hosoe J, Fuchino H, Ikezaki H, Mikage M, Kawahara N, Goda Y. Quality evaluation of essential oils by a taste-sensing system, *Jpn J Food Chem Safety*, 19 (1): 32-37, 2012.

Amakura Y, Fuchino H, Yoshimura M, Yamakami S, Yoshida T, Goda Y, Kawahara N. Comparison of components in the crude drugs “*Scutellariae Radix*” available in Japan. *Pharmaceutical Regulatory Science*, 43 (7): 644-649, 2012.

Yoshimatsu K, Kawano N, Kawahara N, Akiyama H, Teshima R, Nishijima M. Current status of application and commercialization of genetically modified plants for human and livestock health and phytoremediation. *Yakugaku Zasshi*, 132 (5): 629-674, 2012.

Watanabe-Ishitsuka A, Akiyama H, Kondo K, Obitsu S, Kawahara N, Teshima R, Goda Y. Determination of cyanogenic glycoside linamarin in cassava flour using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Jpn J Food Chem Safety*, 19 (1): 38-43, 2012.

Inui T, Kawano N, Shitani N, Yazaki K, Kiuchi F, Kawahara N, Sato F, Yoshimatsu K. Improvement of benzyloquinoline alkaloid productivity by overexpression of 3'-hydroxy-N-methylcoclaurine 4'-O-methyltransferase in transgenic *Coptis japonica* plants. *Boil Pharm Bull*, 35 (5): 650-659, 2012.

Kawano N, Kiuchi F, Kawahara N, Yoshimatsu K. Genetic and phenotypic analyses of a *Papaver somniferum* T-DNA insertional mutant with altered alkaloid composition. *Pharmaceuticals*, 5(2): 133-154, 2012.

Daikonya A, Fuchino H, Takahashi Y, Goda Y, Kawahara N. Inhibitory effect of ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) from Japanese market on nitric oxide production, and metabolome analysis based on LC/MS. *Jpn J Pharmacognosy*, 67 (1): 1-6, 2013.

(2) 特許出願

- ① 本年度特許出願内訳 (国内 1 件、海外 0 件、特許出願した発明数 1 件)
- ② 本プロジェクト期間累積件数 (国内 1 件、海外 0 件)

4. プロジェクト実施体制

(1) 抗 HCV 物質の同定

- ① 研究者グループリーダー名: 堀田 博 (神戸大学・教授)
- ② 研究項目:

インドネシア特有および日本原産の薬用植物資源・天然抽出物由来の抗 HCV 物質の同定と作用機序の解析

(2) HCV ワクチンの開発

- ① 研究者グループリーダー名: 森 康子 (神戸大学・教授)
- ② 研究項目:

HCV タンパク質発現組換え水痘生ワクチン候補株の作製

(3) デング DNA ワクチンの開発

- ① 研究者グループリーダー名: 小西 英二 (神戸大学・客員教授)
- ② 研究項目:

デング DNA ワクチン候補の作製