

ミスマッチ2本鎖 RNA のアヒル B 型肝炎ウイルスに対する
抑制効果に関する研究

伊地知 功史

序 論

B型肝炎ウイルス(hepatitis B virus、HBV)は、ヘパドナウイルス属に分類される直径42nmの球形のエンベロープを有するDNAウイルスである¹⁾。HBV感染は、医療行為における輸血、針刺事故、手術、歯科治療や、性行為などで血液を介して成立する。さらに、HBV持続感染者(キャリア)の母から子への母子感染も認められる。HBV感染より急性肝炎が発症し、HBVキャリアから慢性肝炎や肝硬変が発症する。さらに、HBV感染者の一部には肝細胞癌が発症し^{2,3)}、人の健康において大変重要なウイルス感染症のひとつである。世界中に約3億5千万人のHBVキャリアが存在し、主にアジアやアフリカに多い。また、毎年1万人以上の人々がHBV感染症により命を失っている⁴⁾。

HBVは宿主特異性が高く、人やチンパンジーなど霊長類に感染が認められるのみで、HBVおよびその感染の基礎的、臨床的研究、さらに治療薬開発の推進などの障害になっている。しかし、HBVと同じヘパドナウイルス属にウッドチャック肝炎ウイルス(woodchuck hepatitis virus、WHV)⁵⁾、地リス肝炎ウイルス(ground squirrel hepatitis virus、GSHV)⁶⁾ やアヒルB型肝炎ウイルス(duck hepatitis B virus、DHBV)^{7,8)}が認められるようになった。これらのウイルスのゲノム構造がHBVと類似していることから(Fig.1)、WHV は主に肝細胞癌の発癌モデルとして使用され、またX遺伝子を持たないDHBVは無症候性キャリアや慢性肝炎のモデルとして、あるいはウイルス複製の解析および抗ウイルス剤の活性評価などの研究に用いられている⁹⁻¹²⁾。これらのウイルスを用いた研究により、HBVの特性やユニークな複製過程が明らかとなっている。

HBVは不完全な2本鎖DNAを持ち、肝細胞表面のレセプターに吸着侵入後、核内で完全な2本鎖DNAとなる。環状の形態を示すDNAはrelaxed circular DNA (RC)、線状のものはlinear DNA (L)と呼称されている。この2本鎖DNAは複製過程で安定したコイル状のsuper coiled DNA (SC)の形態を取り、このSCから2.1kbと3.3kbの長短2種類のmRNAが転写される。3.3kbのmRNAはDNAの鋳型として働き、ウイルス遺伝子にコードされている逆転写酵素によりDNAが合成されて行く(Fig.2)¹³⁻¹⁹⁾。この一連の複製過程のいずれかの遮断によりウイルス増殖が阻害され、抗ウイルス剤の標的となり得る。

現在、HBV感染症の治療には主にインターフェロン(IFN)やlamivudine、adefovirなどの核酸類似体が用いられ、その治療効果が認められている²⁰⁻²⁷⁾。IFNが誘導する抗ウイルス活性に関与する酵素の中で、2'-5'オリゴアデニル酸合成酵素(2'-5' oligoadenylate synthetase、2'-5' AS)と2本鎖RNA依存プロテインキナーゼ(dsRNA dependent protein kinase、PKR)がよく知られている(Fig.3)²⁸⁾。2'-5' ASはウイルス由来等の2本鎖RNAと結合して活性化され、ATPを基質としてリボース環の2'と5'の位置にリン酸結合をしたオリゴアデニル酸を合成する。このオリゴアデニル酸が細胞内に不活化型で存在するRNA分解酵素(RNase L)を活性化し、ウイルスのmRNAや28SリボソームRNAを分解し、ウイルス蛋白の合成を抑制する^{29,30)}。また、PKRはウイルス由来等の2本鎖RNAによって活性化され自己リン酸化した後、蛋白合成開始因子であるeIF2 α (α subunit of eukaryotic translation initiation factor 2)をリン酸化する。リン酸化されたeIF2 α はGTP結合能が低下し、その結果、蛋白合成が開始されずウイルス複製が阻害される(Fig.3)³¹⁾。

lamivudineやadefovirなどの核酸類似体の抗ウイルス活性の評価は、HBVDNAが人工的に組み込まれたHB611³²⁾、HepG2.2.2.15³³⁻³⁵⁾の肝癌細胞系や、DHBVの自然感染系をHBV感染モデルとして用いて行われてきた³⁶⁻⁴²⁾。これらの核酸類似体は、細胞内で宿主の酵素でリン酸化され三リン酸体となり、本来の基質を競合的に拮抗することによりHBVのウイルスDNA合成酵素(逆転写酵素)を阻害するとされている⁴³⁾。したがって、HBVを抑制する核酸類似体の一部は、逆転写酵素を有するヒト後天性免疫不全ウイルス(human immunodeficiency virus、HIV)の複製も抑制する^{44,45)}。

IFN誘導体として知られているミスマッチ2本鎖RNA(mismatched double-stranded RNA、m-dsRNA)は、poly(I):poly(C)の類似体で、シチジンポリマーにウリジンが12対1の割合で構成されている(poly(I):poly(C₁₂-U))。塩基部にアミノ基を持たないウリジンとイノシンが水素結合できないために、この部位がミスマッチとなりRNaseの基質になりやすい構造になっている。したがって、poly(I):poly(C)に比べ分解されやすく、IFN誘導体としての能力はpoly(I):poly(C)に劣るが、生体に対する副作用が軽減されるという利点がある⁴⁶⁾。また、m-dsRNAはIFNのみならず他のリンフォカインの誘導やナチュラルキラー細胞の活性化を導くとされており、*in vitro*においてヒトのグリオーマやメラノーマに対して抗腫瘍効果を示すことが認められている⁴⁷⁻⁴⁹⁾。しかし、ウイルス感染症に関しては、

HIVに対して抑制効果を示すことが報告されているのみで^{50,51)}、その他のウイルス感染症に対しての報告はほとんどなされていない。

以上の諸点より、IFNを誘導するとされているm-dsRNAにHBVの複製抑制作用があると仮定し、HBV感染モデルとしてアヒルを使用したDHBV感染系を用い、m-dsRNAのHBVウイルス抑制作用を*in vitro*および*in vivo*で検討し、その有益性を核酸類似体と比較した。

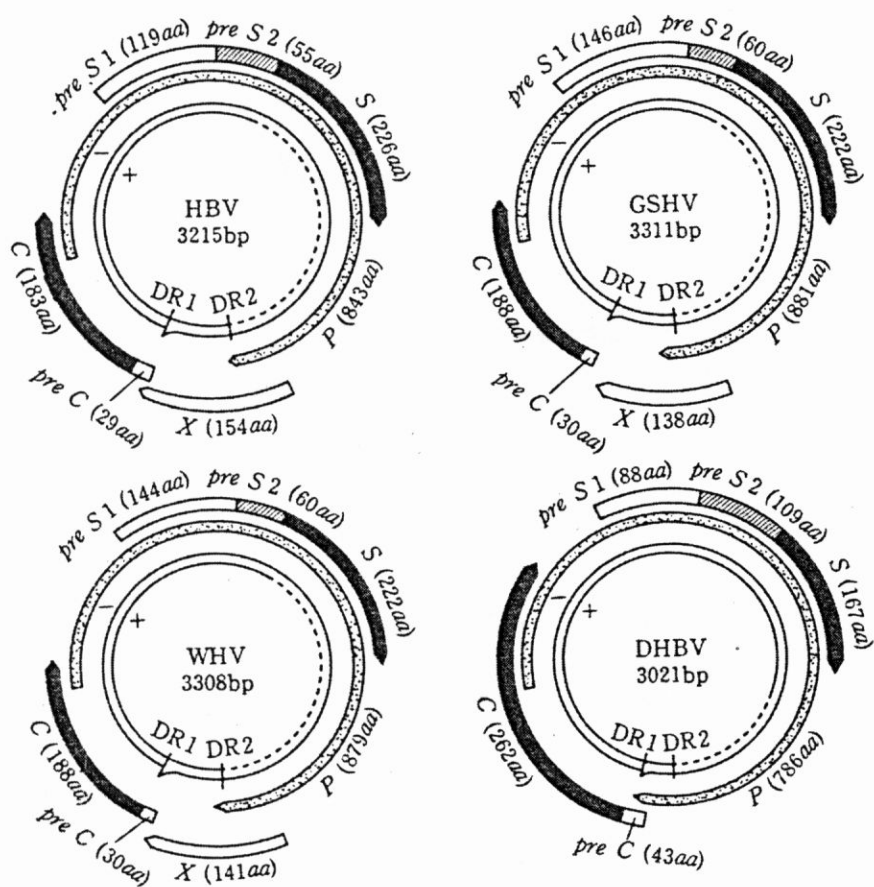


Fig.1 ヘパドナウイルス属のゲノム構造の比較¹⁾

HBV:hepatitis B virus (B型肝炎ウイルス)

GSHV:ground squirrel hepatitis virus (地リス肝炎ウイルス)

WHV:woodchuck hepatitis virus (ウッドチャック肝炎ウイルス)

DHBV:duck hepatitis B virus (アヒルB型肝炎ウイルス)

DHBVはX遺伝子を保有せず、他のヘパドナウイルスとは異なり肝臓の発癌と関連する確率は低いとされている⁵²⁾。

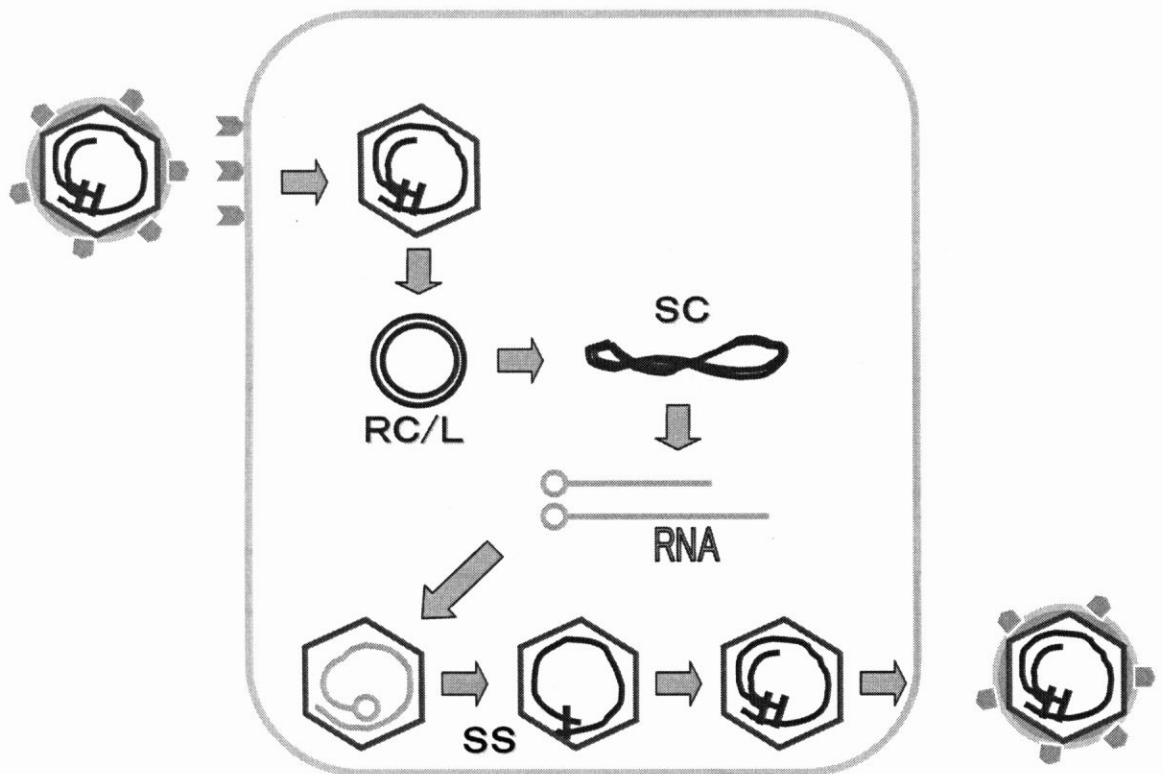


Fig.2 ヘパドナウイルス(HBV)の複製

不完全な2本鎖DNAを保有するHBVは、肝細胞に吸着侵入後、核内で完全な2本鎖DNAとなる
(詳細は本文参照)。

RC: relaxed circular DNA、 L: linear DNA、 SC: super coiled DNA、
SS: single stranded DNA

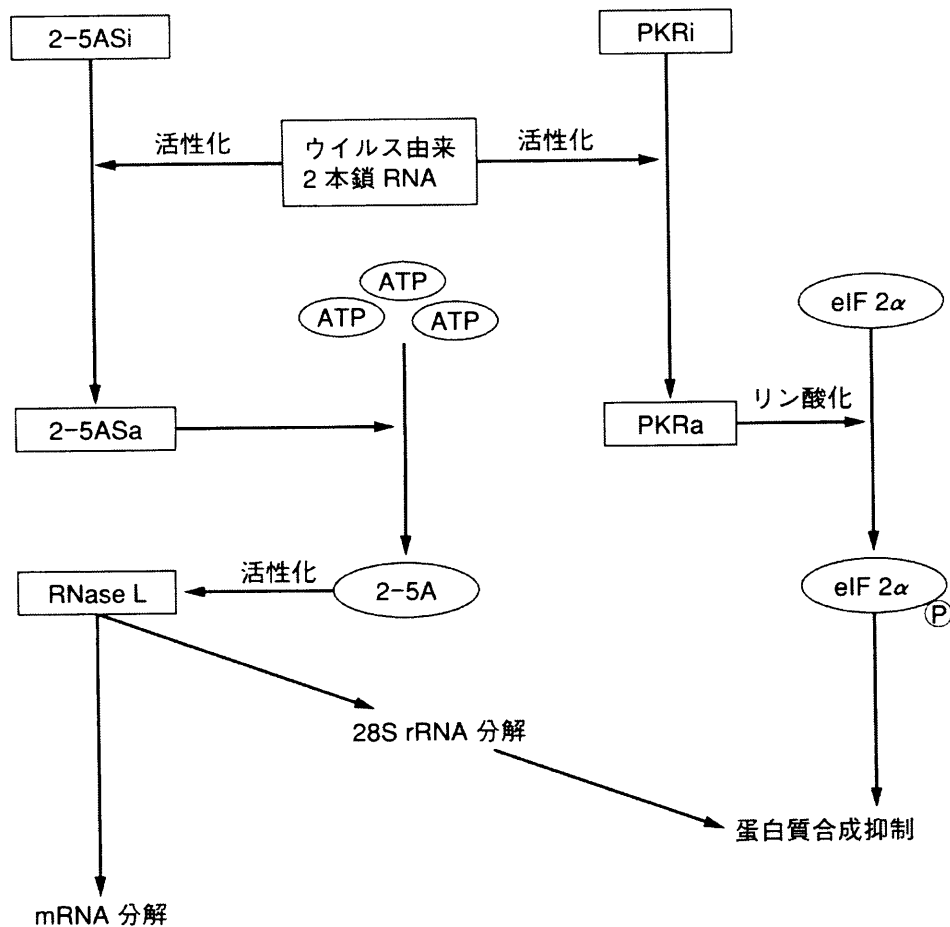


Fig.3 IFNの抗ウイルス作用機序⁵³⁾

IFNにより2'-5'オリゴアデニル酸合成酵素と2本鎖RNA依存プロテインキナーゼが誘導される。これらは2本鎖RNAにより活性化され、最終的にウイルスのmRNAや28SリボゾームRNAを分解し、ウイルス蛋白の合成を抑制する(詳細は本文を参照)。

2-5ASi: 不活性型2'-5' oligoadenylate synthetase

2-5ASa: 活性型2'-5' oligoadenylate synthetase

PKRi: 不活性型dsRNA dependent protein kinase

PKRa: 活性型dsRNA dependent protein kinase

研究目的

本研究は、以下の3点の検討を目的とした。

- 1、m-dsRNAのDHBV複製抑制作用の有無を明らかにする。
- 2、抑制作用が認められた場合、その作用機序を明らかにする。
- 3、m-dsRNAと核酸類似体の抑制作用の相違点を明らかにする。

材料および方法

(1) DHBV感染アヒルの作製

孵化2日後の国内産アヒル(椎名人工孵化場、千葉)に、DHBV陽性血清を50 μ l 静脈内投与しDHBVを感染させた。DHBV陽性血清中のウイルス量はスポットハイブリダイゼーション法により算出し、 4×10^9 virions/mlのウイルス量の血清を用いた。この感染により全てのアヒルが接種2日後からウイルス血症を呈し、肝炎症状を伴わない無症候性キャリアとなる⁵⁴⁾。

(2) 化合物

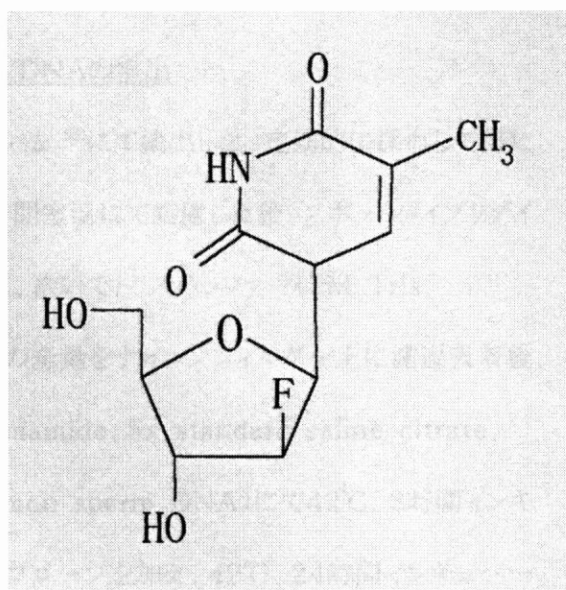
m-dsRNA(poly(I):poly(C₁₂-U))は発酵法によりヤマサ醤油(株)(千葉)で作製されたものを使用した。凍結乾燥されたm-dsRNAを蒸留水で溶解後、0.45 μ mのミリポアにて除菌し、滅菌した5x PBSを加え、37 $^{\circ}$ Cで一昼夜保温して調整したものを投与試験に用いた。試験管内抑制実験には、L-15培養液にて希釈して用いた。

m-dsRNAと比較検討するために用いた核酸類似体である1-(2'-deoxy-2'-fluoro- β -D-arabinofuranosyl)-5-methyluracil (D-FMAU) (Fig.4)は、ヤマサ醤油(株)で合成された。

D-FMAUはL-15培養液にて希釈し、試験管内抑制実験に用いた。

Fig.4 D-FMAUの構造式

D-FMAUはウリジンの核酸類似体で、HBVとDHBVに対する複製抑制作用が認められている^{35,37)}。



(3) m-dsRNAのDHBV感染アヒルにおける複製抑制実験(*in vivo*)

8週齢のDHBV持続感染アヒルを用いた。単回投与試験では、9羽のアヒルにm-dsRNAを5mg/kg、静脈内投与した後、血液中のDHBVDNA量を連日測定した。対照群のアヒル(10羽)にはm-dsRNAの代わりに滅菌生理食塩水を静脈内投与した後、同様に採血し測定した。また、DHBVDNA量の投与前値として、投与直前と投与1週間前に採血し血液中のDHBVDNA量を調べた。

複数回投与試験において、4羽のアヒルに0.2mg/kg、6羽のアヒルに1.0mg/kgのm-dsRNAを1週間連日静脈内投与した。対照群のアヒル(4羽)にはm-dsRNAの代わりに滅菌生理食塩水を1週間連日静脈内投与した。血液中のDHBVDNA量を測定するために週に1～2回採血した。また、DHBVDNA量の投与前値として、投与直前と投与1週間前の血液中のDHBVDNA量を調べた。

(4) DHBVDNA プローブの作製

DHBVDNAの検出に放射性同位体で標識したDHBVDNAプローブを用いた。プローブDNAは、プラスミド(pBR322)のEcoR I サイトに組み込まれたDHBV遺伝子⁵⁴⁾の全領域を切り出し、アガロースゲル電気泳動で分離、抽出し、 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$ を用いて標識した($8\sim 10\times 10^7$ cpm/ μg)。DHBV遺伝子が組み込まれたプラスミドは、内田俊和博士(日本大学)から分与していただいた。

(5) スポットハイブリダイゼーション法による血液中DHBVDNAの検出

血液中のDHBVDNA量をスポットハイブリダイゼーション法⁵⁵⁾にて検出した。定期的に採血して得た血清20 μl に同量のアルカリ液(1M NaOH)を加え10分間室温にて処置した後、スポットハイブリダイゼーション用の96穴プレート(池田理化)のウェルに分注し、次いでトリスバッファー(1M Tris、2.5M NaCl)を分注して中和した。各ウェル内の処理液の全量をナイロンフィルター上に濾過吸着後、UV照射固定し、プレハイブリダイゼーション液(50% formamide、5x standard saline citrate、5x Denhardts' solution、100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ sonicated salmon sperm DNA)にて42℃、3時間インキュベートした。さらに、 2×10^7 cpmの ^{32}P 標識DHBVDNAプローブを加え、42℃、24時間インキュベートした。最後に、洗浄液(0.1x standard saline citrate、0.2% sodium dodecyl sulfate)にて

50℃、10分間、3回洗浄後、乾燥させたナイロンフィルターをKodak XAR-5 filmで、-70℃、24～48時間、露出处置した。

(6) DHBV感染アヒル肝組織の採取

8週齢のDHBV持続感染アヒルからm-dsRNA投与前と、5mg/kg単回投与2日後の肝組織を採取し検索に供した。アヒルはジエチルエーテルで麻酔した。採取した肝臓の組織は直ちに液体窒素で凍結後、DNAを抽出するまで-80℃に保存した。

(7) DHBV感染アヒル肝組織からのDNA抽出とサザンハイブリダイゼーション

肝組織からのDNA抽出は、内田らの方法⁵⁴⁾に若干の変法を加え行った。凍結した肝組織(約0.2g)を、ハンマーを用いてドライアイス上で粉状に砕き、エクストラクションバッファー(0.01M Tris-HCl (pH 8.0)、0.01M NaCl、0.1M EDTA、1% SDS、200μg/ml proteinase K)を加え、37℃、24時間インキュベートし溶解した。次いで、フェノール・クロロホルム/イソアミルアルコール(24:1)を加えDNAを抽出した。DNA抽出液は、RNAを除去するためにDNase free の RNase (100μg/ml)で、37℃、1時間処置し、sephadex G-150 column (Pharmacia) で精製、濃縮した。

肝組織から精製したDNA(10μg)を用いて、サザンハイブリダイゼーション法⁵⁶⁾によりDHBVDNAを検出した。1%アガロースゲルをTAEバッファー(40mM Tris (pH 7.2)、20mM Na acetate、1mM EDTA)で電気泳動後、変性、中和処置して、ナイロンフィルターにブロットした。乾燥させたナイロンフィルターをUV照射で固定し、前述した同じ方法で標識DHBVDNAプローブとハイブリダイゼーションを行った。

(8) DHBVDNAの解析

血液中のウイルスDNA量および肝組織中のウイルス複製パターンを解析するために、AMBIS Radioanalytic Imaging System (AMBIS System)を用いて、ハイブリダイゼーション処置したナ

イロンフィルターの放射活性を測定した。血液中のDHBVDNA量はプラスミド(pBR322)に組み込まれたDHBV遺伝子を標準DNAとし、その放射活性を基準に定量化した。

(9) 統計解析

DHBV感染アヒルを用いた実験において、m-dsRNA(処置群)あるいは滅菌生理食塩水(対照群)投与前後のアヒル血液中のDHBVDNA量を定量化し、その変化の割合を算出し比較検討した。血液中のDHBVDNA量の変化率は、平均値±標準誤差で表した。その変化率を処置群と対照群で比較し、Mann-Whitney U testを用いて有意差検定を行った。

(10) 血液中のIFN活性と2'-5'オリゴアデニル酸合成酵素活性の測定

アヒル血液中のIFN活性をプラーク法により測定した。14日齢のアヒル胎児線維芽細胞を5% NCS (newborn calf serum) MEM (Eagle's minimum essential medium)で、37℃、2日間、5% CO₂ 培養器で培養した後、上清を除去し、5%NCS MEMで段階希釈した試料血清を加え、さらに37℃で24時間処置した。次いで、試料血清を除去し100 pfu (plaque forming unit) の VSV (vesicular stomatitis virus)を30分間吸着させたあと、2.5% NCS MC (0.5% methyl-cellulose maintenance medium) にて、37℃、2日間、培養した。培養終了後、0.5%クリスタルバイオレットで染色し、顕微鏡下でプラーク数を測定した。IFN活性は、プラーク形成を50%抑制する試料血清の最大希釈倍数で表した。血液中の2'-5'オリゴアデニル酸合成酵素活性は、市販のラジオイムノアッセイキット(栄研化学)を用いて測定した。

(11) DHBV感染アヒルの初代肝細胞培養

孵化2日後の国内産アヒルに、DHBV陽性血清(4×10^9 virions/ml)を50 μ l 静脈内投与してDHBVを感染させた。感染2週間後、アヒルをジエチルエーテルで吸入麻酔し、Tuttleman⁵⁷⁾ら及び内田らの方法⁵⁴⁾に若干の変法を加えたコラゲナーゼ灌流法により肝細胞を回収した。

麻酔下でアヒルを開腹後、門脈から40℃に保温した前灌流バッファー(0.5mM EGTA、10mM

HEPES、73.1mM NaCl、5.37mM KCl、0.9mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、pH 7.2)を100ml注入し、さらに40℃に保温したコラゲナーゼ含有灌流バッファー(0.025% collagenase、10mM HEPES、73.1mM NaCl、5.37mM KCl、0.9mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、5mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、pH 7.2)を50ml注入した。その後、肝臓をシャーレ内で細切し、コラゲナーゼ含有灌流バッファーで37℃、10分間、恒温槽内で消化した。消化処理した肝細胞は100メッシュで濾過し、冷却した洗浄液(L-15 medium、20mM HEPES)で4℃、600rpm、1分間、上清が透明になるまで洗浄し、肝細胞を分離精製した。精製した肝細胞は、0.25%のトリパンブルーで生細胞を計測し、培養液(L-15 medium、5% heat in-activated fetal calf serum、 $2 \times 10^{-8}\text{M}$ insulin、 10^{-5}M hydrocortizone、20mM HEPES、100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ streptomycin、100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ampicillin)で 5×10^5 cells/mlに調整後、37℃、5% CO_2 培養器で培養し実験に供した。

(12) DHBV感染初代肝培養細胞での抑制実験(*in vitro*)

化合物連続処理実験において、初代肝培養細胞の培養2日後から前述した培養液に段階希釈したm-dsRNAとD-FMAUを加え、37℃、5% CO_2 培養器で培養し、16日後に肝細胞を回収し細胞DNAを抽出した。化合物添加培養液は1日おきに新しい培養液と交換した。肝細胞からのDNAの抽出は、スクレーパーで肝細胞を回収し、前述した肝組織からのDNA抽出と同じエクストラクションバッファーを加え、同様の方法で行った。

化合物除去実験では、化合物添加培養液で16日間培養後、化合物無添加培養液でさらに7日間、37℃、5% CO_2 培養器で培養し、肝細胞を回収後、DNAを抽出した。

DHBVDNAの検出は、抽出した肝細胞DNA(5 μg)を $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$ で標識したDHBVDNAプローブを用いて、前述したスポットハイブリダイゼーション法あるいはサザンハイブリダイゼーション法により行った。また、m-dsRNAとD-FMAUの抗ウイルス活性は、DHBVDNA量を50%抑制する濃度(ED_{50})を算出して評価した。結果は、平均値 \pm 標準誤差で表した。

(13) DHBV感染初代肝培養細胞におけるDHBVRNAの解析

m-dsRNA(1.0 μ g/ml)とD-FMAU(0.1 μ g/ml)を添加した培養液で16日間培養した肝細胞からRNAを抽出した。RNAの抽出はAGPC(acid guanidinium thiocyanate phenol-chloroform)法⁵⁸⁾に準じて行った。精製した肝細胞RNA(15 μ g)を1%アガロースゲルで電気泳動後、ナイロンフィルターにブロットし、 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$ で標識したDHBVDNAプローブを用いて、前述した方法でハイブリダイゼーションを行い、DHBVRNAを検出した。

結 果

(1) DHBV感染アヒルに対するm-dsRNA単回投与による抑制作用

(1)-1、血液中DHBVDNA量の変化

m-dsRNA 5mg/kg単回投与により、投与した全てのアヒルの血液中DHBVDNA量の減少が認められた(Fig.5)。スポットハイブリダイゼーションにより血液中のDHBVDNA量を定量化し、その経時の変化率の解析を行った。投与1日から3日後までm-dsRNA投与群で対照群に比べ約50~80%まで抑制され、統計学的に有意なDHBVDNA量の減少が認められた($P < 0.002$)(Fig.6)。しかし、投与4日後にはDHBVDNA量は増加し、対照群と同水準に復した。m-dsRNAはDHBVDNA合成量を抑制することが明らかとなり、その作用は一過性である事が認められた。

(1)-2、肝組織DHBVDNA合成抑制作用

m-dsRNAは血液中のDHBVDNA量を減少することが認められたので、肝組織におけるDHBV複製に対する作用を調べた。m-dsRNA 5mg/kg投与前と投与2日後の肝組織におけるDHBVDNA複製様式をサザンハイブリダイゼーションで解析した。滅菌生理食塩水を投与したアヒルでは、肝組織におけるDHBVDNA合成の抑制は認められなかったが、m-dsRNA投与アヒルの全例でDHBVDNA合成抑制が認められた(Fig.7)。放射活性測定による解析ではDHBVDNA複製過程におけるRC、SC、SSは、それぞれ約45~65%抑制された(Fig.8)。m-dsRNAはDHBVDNA複製の全ての過程において合成を抑制することが認められた。

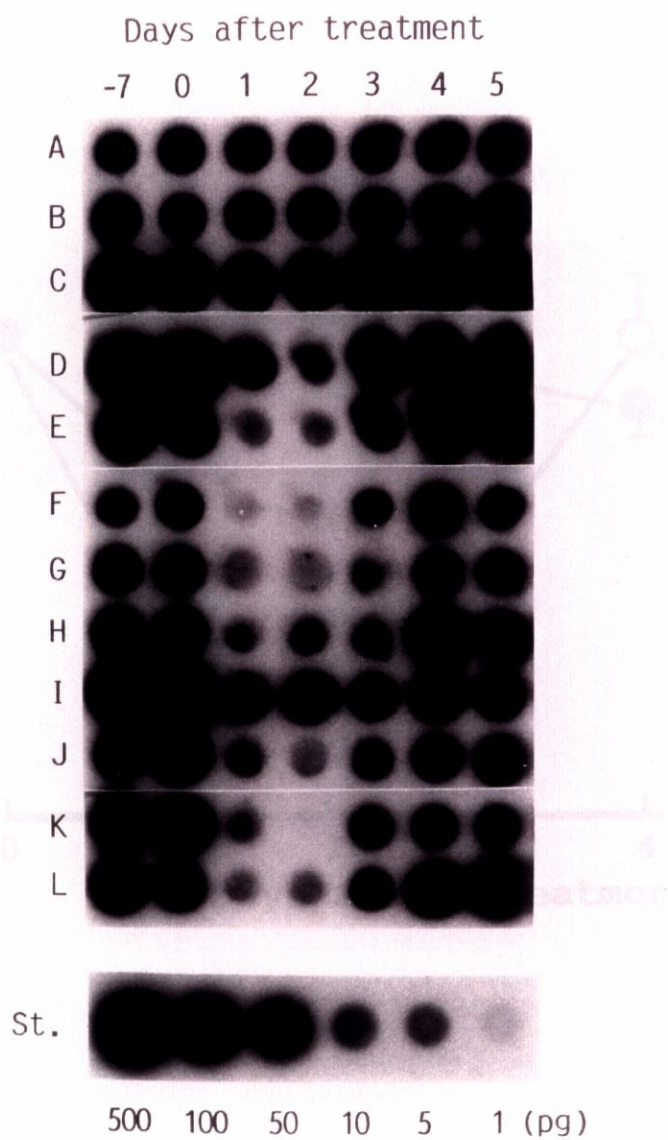


Fig.5 DHBV感染アヒルにおけるm-dsRNA単回投与後の血液中DHBVDNA量の変化

(スポットハイブリダイゼーション)

A～C: 滅菌生理食塩水投与群

D～L: m-dsRNA、5mg/kg単回投与群

St: クローンDHBVDNAの段階希釈

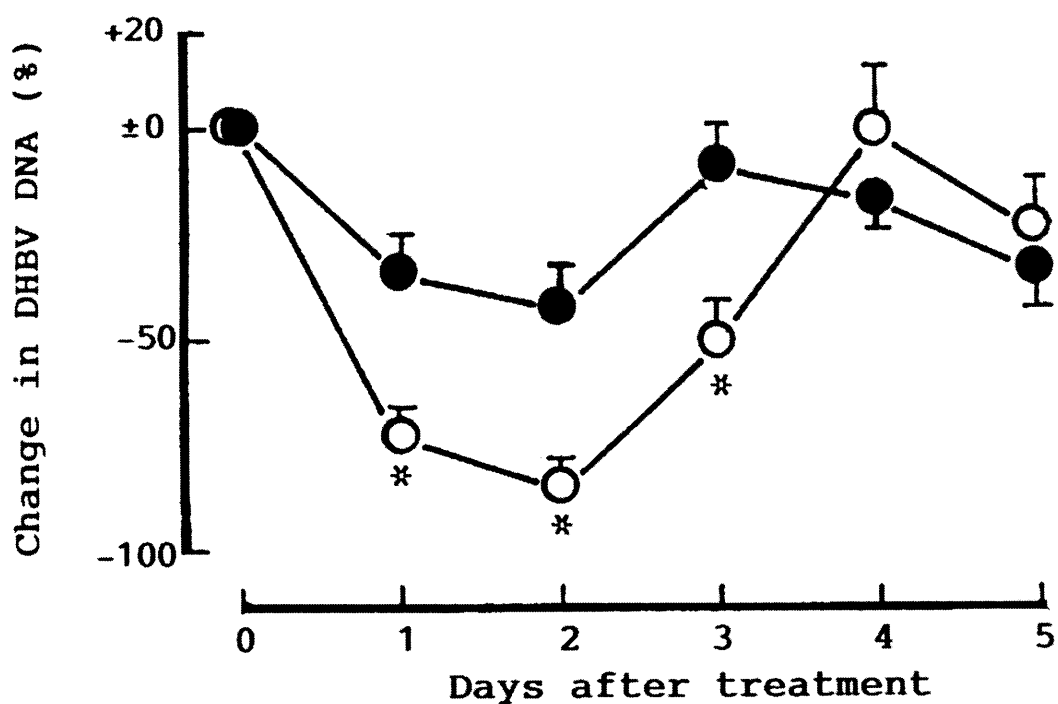


Fig.6 DHBV感染アヒルにおけるm-dsRNA単回投与後の血液中DHBVDNA量変化率

DHBVDNA量の変化率を平均値±標準誤差で表示した。

●: 滅菌生理食塩水投与群(10羽)

○: m-dsRNA、5mg/kg単回投与群(9羽)

※: $P < 0.002$ (Mann-Whitney U test)

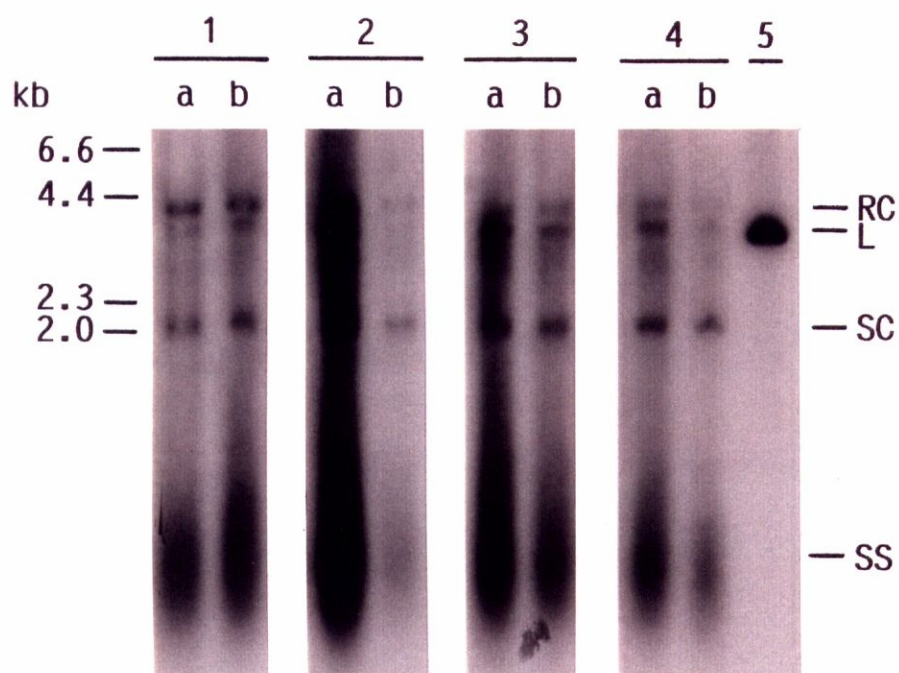


Fig.7 DHBV感染アヒルにおけるm-dsRNA単回投与後の肝組織のDHBVDNAの変化

(サザンハイブリダイゼーション)

1: 滅菌生理食塩水投与アヒル

2~4: m-dsRNA、5mg/kg投与群

5: クローンDHBVDNA

a: 処置前

b: 処置2日後

RC: relaxed circular DNA、 L: linear DNA、 SC: super coiled DNA、

SS: single stranded DNA

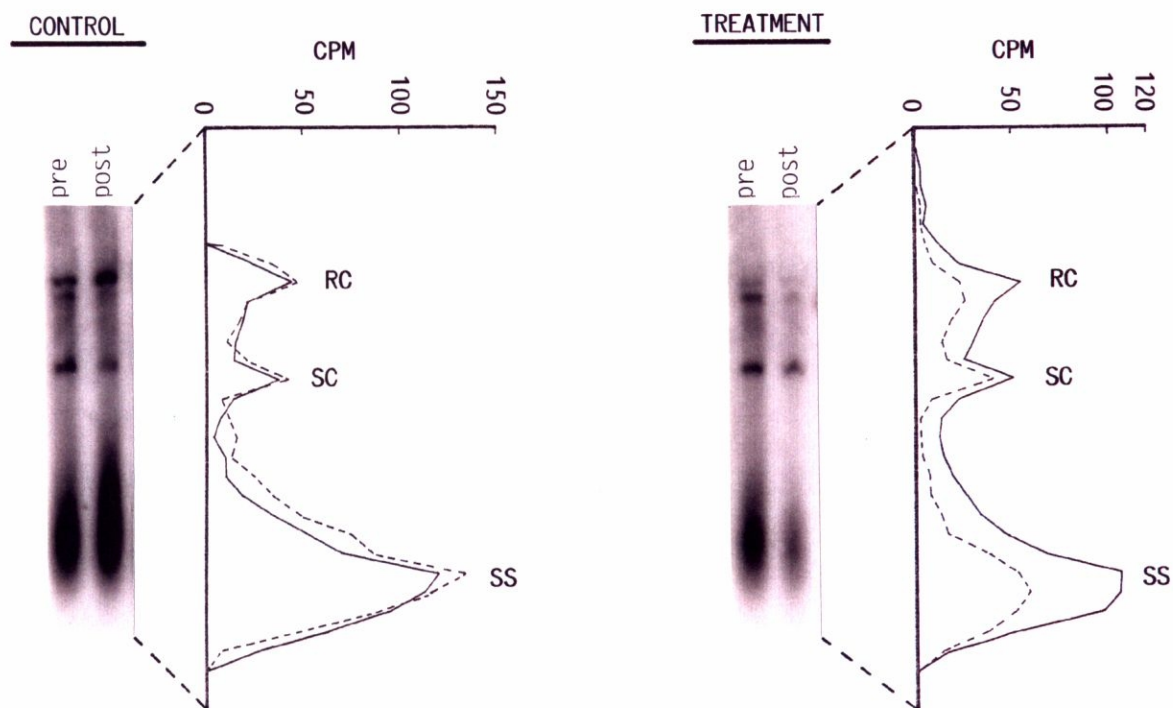


Fig.8 DHBV感染アヒルにおけるm-dsRNA単回投与後の肝組織のDHBVDNA複製の変化

Control: 滅菌生理食塩水投与

Treatment: m-dsRNA、5mg/kg投与

Pre: 処置前

Post: 処置2日後

RC: relaxed circular DNA、 SC: super coiled DNA、 SS: single stranded DNA

(1)－3、血液中IFN活性と2'－5'オリゴアデニル酸合成酵素活性の経時的変化

DHBV感染アヒルにおけるm－dsRNA投与(5mg/kg)後の血液中のIFN活性と2'－5'オリゴアデニル酸合成酵素活性を、投与前、投与3、6、9、12、24、48時間後に測定した。

IFN活性はm－dsRNAを投与した全てのアヒル(4羽)において認められ、その活性は、投与3時間後に極値に達した(Fig.9)。極値時の平均IFN活性は375.6 experimental units/mlであった。その後、IFN活性は急速に低下し、投与24時間後には投与前の活性値に復した。一方、2'－5'オリゴアデニル酸合成酵素活性は、IFN活性が極値となった3時間後から徐々に上昇し、投与48時間後においても1600pmol/dl以上の高い活性が維持された。

DHBV感染アヒルにおいてm－dsRNAはIFN産生を誘導し、引き続き2'－5'オリゴアデニル酸合成酵素の産生を誘導することが認められた。

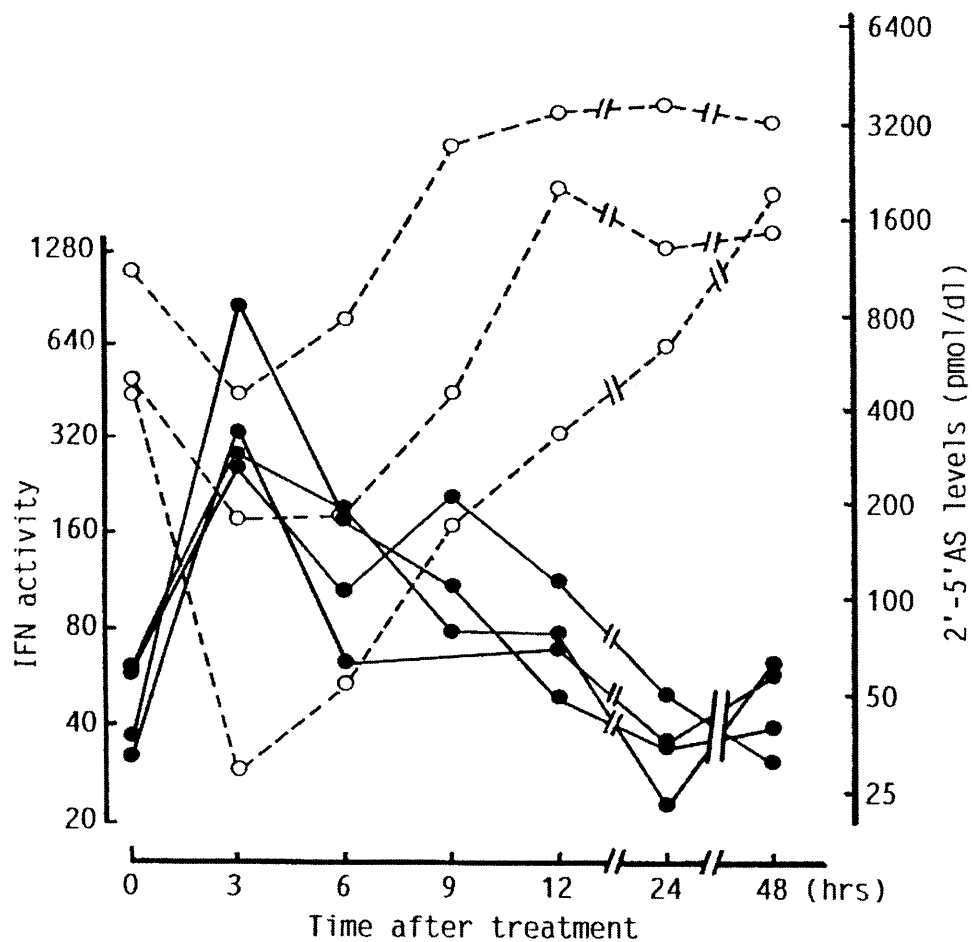


Fig.9 DHBV感染アヒルにおけるm-dsRNA単回投与後の血液中IFN活性と2'-5'オリゴアデニル

酸合成酵素活性

●: IFN活性(4羽)

○: 2'-5'オリゴアデニル酸合成酵素活性(3羽)

横軸はm-dsRNA(5mg/kg)投与後の時間を示す。

(2) DHBV感染アヒルにおけるm-dsRNAの複数回投与による抑制作用

(2)-1、血液中DHBVDNA量の変化

m-dsRNAの単回投与により一過性であるが、DHBV複製の抑制が認められたので、投与回数を増加し抑制実験を行った。m-dsRNA 0.2mg/kg(4羽)あるいは1.0mg/kg(6羽)、7日間連続静脈内投与により、投与終了時には全てのアヒルで血液中DHBVDNA量の低下が認められた(Fig.10)。また、一部のアヒルには投与終了2週後においても持続的な抑制作用が認められた。滅菌生理食塩水を投与した対照群(4羽)ではDHBVDNA量の低下は認められなかった。

単回投与実験と同様に、血液中DHBVDNA量の経時的な変化率の解析を行った。投与終了時には0.2mg/kg群と1.0mg/kg群において、それぞれDHBVDNA量は約76%および約65%減少し、対照群と比較して統計学的に有意なDHBVDNA複製の抑制が認められた($P < 0.05$)(Fig.11)。また、投与終了後、血液中DHBVDNA量は上昇傾向を示したが、終了2週後においてなお約50%が抑制されていた。また、m-dsRNAの0.2mg/kg投与群と1.0mg/kg投与群における抑制作用には有意差は認められなかった。m-dsRNAの連続投与により、単回投与では認められなかったDHBV複製の持続的な抑制が認められた。

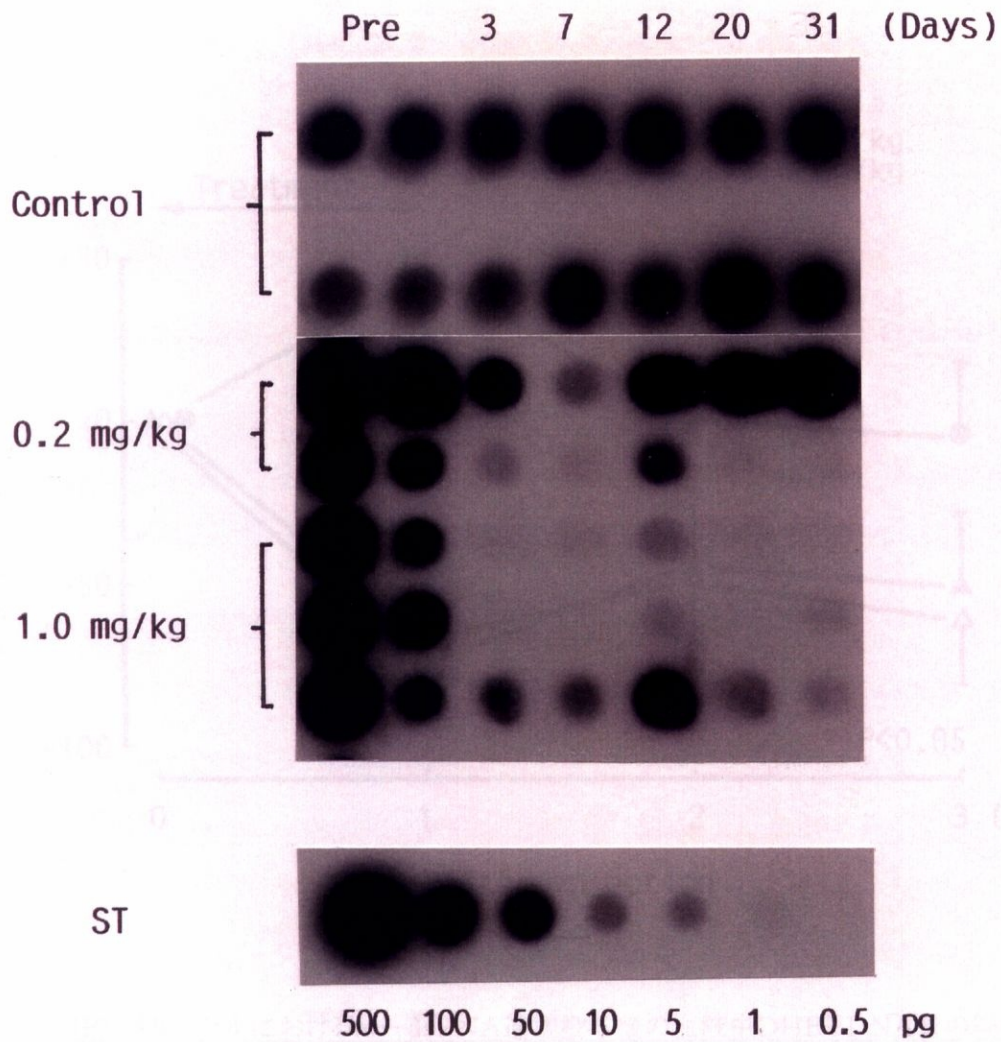


Fig.10 DHBV感染アヒルにおけるm-dsRNA連続投与後の血液中DHBVDNA量の変化
(スポットハイブリダイゼーション)

対照群のアヒルには滅菌生理食塩水を7日間連続投与した。

m-dsRNAは0.2mg/kgあるいは1.0mg/kgを7日間連続投与した。

St: クローンDHBVDNAの段階希釈

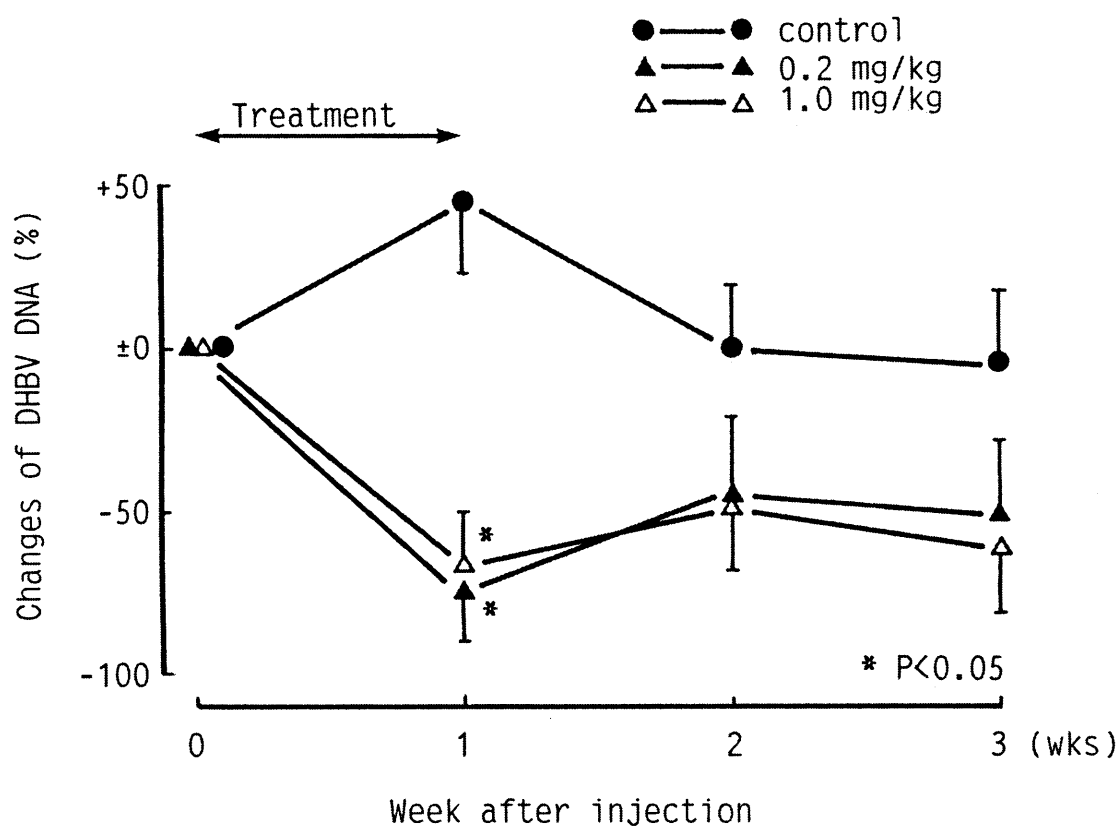


Fig.11 DHBV感染アヒルにおけるm-dsRNA連続投与後の血液中DHBVDNA量の経時的変化

DHBVDNA量の変化率を平均値±標準誤差で表示した。

●: 滅菌生理食塩水投与群(4羽)

▲: m-dsRNA、0.2mg/kg、7日間連続投与群(4羽)

△: m-dsRNA、1.0mg/kg、7日間連続投与群(6羽)

※: P<0.05 (Mann-Whitney U test)

(3) DHBV感染初代肝培養細胞におけるm-dsRNA及びD-FMAUによるDHBV複製抑制

(3)-1、DHBV初代肝培養細胞におけるDHBVDNAの複製

DHBV感染アヒルの初代肝細胞を培養し、DHBV複製の経時的変化を調べた。DHBVDNAは培養直後から16日後まで肝細胞内で徐々に増加し、16日以降はほぼ平衡に達した(Fig.12)。しかし、DHBVDNAは培養上清にほとんど検出されなかった。この結果から、初代肝培養細胞における化合物の抑制実験の評価は培養16日後の肝細胞内のDHBVDNA量を基準として行った。

(3)-2、DHBV感染初代肝培養細胞におけるm-dsRNA及びD-FMAUのDHBVDNA複製に対する抑制作用

DHBV感染初代肝培養細胞のm-dsRNA及びD-FMAU添加16日間培養では、化合物の濃度依存的にDHBVDNA複製の抑制が認められた(Fig.13)。DHBVDNA複製を50%抑制する濃度(ED_{50})はm-dsRNAで $0.34 \pm 0.06 \mu\text{g/ml}$ 、D-FMAUで $0.007 \pm 0.001 \mu\text{g/ml}$ であり、D-FMAUはm-dsRNAの約48倍強い抑制活性を示した。また、m-dsRNA添加培養上清中にはIFN活性は検出されなかった。

(3)-3、化合物によるDHBV複製抑制の持続

化合物添加培養液で16日間培養後、さらに7日間の化合物無添加培養後のDHBVDNA複製の抑制を検討した。m-dsRNAの $0.5 \pm 0.07 \mu\text{g/ml}$ 相当投与量が投与中止前の ED_{50} : $0.34 \pm 0.06 \mu\text{g/ml}$ に相当し、m-dsRNAの抑制作用は化合物添加中止後、少なくとも7日間持続した(Fig.14)。m-dsRNAの持続抑制作用は、DHBV感染アヒルにおける連続投与による抑制作用と同じであり、*in vitro*で再現性が認められた。

一方、D-FMAUは添加中止により、 $0.12 \pm 0.09 \mu\text{g/ml}$ 相当投与量でDHBVDNA複製が50%抑制されたが、その抑制作用は化合物添加中止により約17倍減少した(Fig.14)。D-FMAUにはm-dsRNAで認められた化合物添加中止後の持続的抑制作用が認められず、両者の化合物におけるDHBVDNA複製抑制作用機序の相違が推定される。

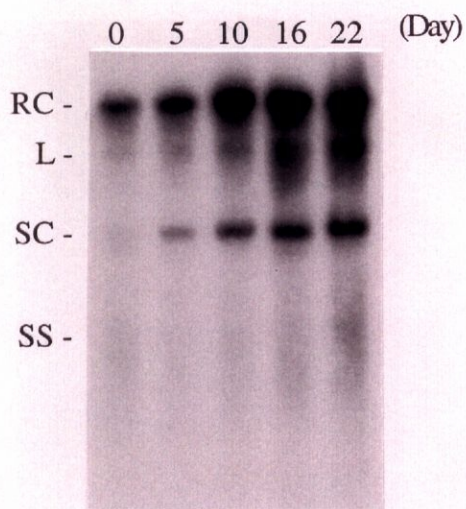


Fig.12 DHBV感染初代肝培養細胞におけるDHBVDNAの複製(サザンハイブリダイゼーション)

初代肝培養細胞培養直後から22日までのDHBVDNA複製の経時的変化を示す

RC: relaxed circular DNA、L: linear DNA、SC: super coiled DNA、

SS: single stranded DNA

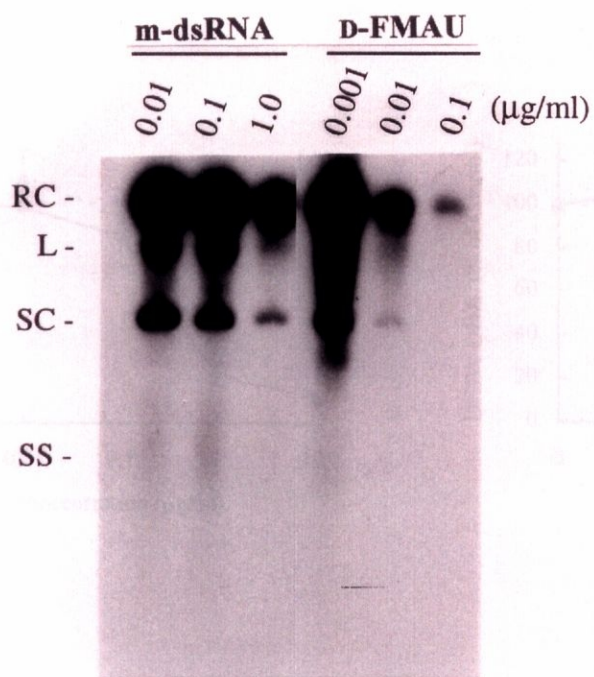


Fig.13 DHBV感染初代肝培養細胞におけるm-dsRNA及びD-FMAUのDHBVDNA複製抑制作用(サザンハイブリダイゼーション)

RC: relaxed circular DNA、L: linear DNA、SC: super coiled DNA、
SS: single stranded DNA

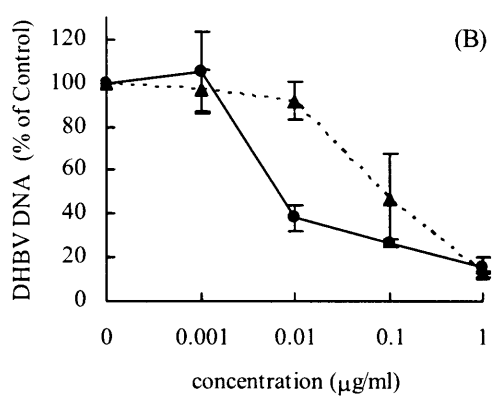
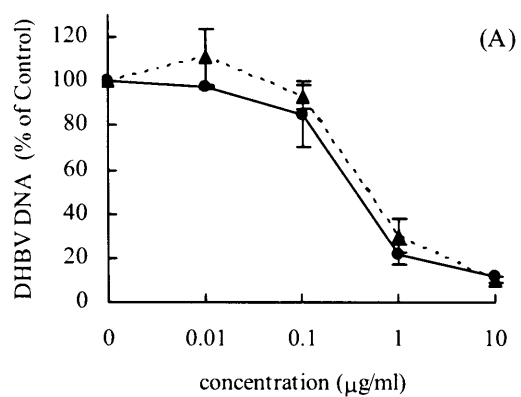


Fig.14 化合物除去後のDHBVDNA複製抑制の持続

A: m-dsRNAによる抑制

B: D-FMAUによる抑制

実線: 16日間連続化合物添加による抑制

波線: 16日間連続化合物添加後、7日間、化合物無添加培養における抑制

(3)－4、 DHBV感染初代肝培養細胞におけるm－dsRNA及びD-FMAUのDHBVRNAに対する抑制作用

添加中断後の抑制作用の持続性がm－dsRNAとD-FMAUでは異なるためDHBVRNA転写に対する抑制作用を検討した。

m－dsRNAとD-FMAUのそれぞれDHBVDNA複製を約80%抑制する濃度で16日間添加培養した。m－dsRNAは対照と比べDHBVRNA転写を著しく抑制した。D-FMAUにおいてもDHBVRNA転写の抑制を認めたが、その作用はm－dsRNAよりも明らかに低値であった(Fig.15)。

m－dsRNAは主としてDHBVRNA転写を、また、D-FMAUは主としてDHBVDNA複製を抑制していると推定された。

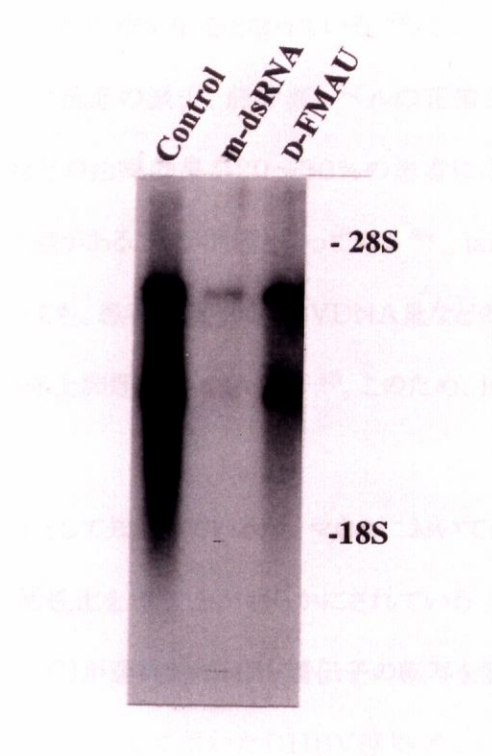


Fig.15 DHBV感染初代肝培養細胞におけるm-dsRNA及びD-FMAUのDHBVRNAに対する抑制作用(ノーザンハイブリダイゼーション)

18S、24S: リボゾームRNAの位置を示す

考 察

現在、HBV感染症の治療はIFN療法とlamivudineやadefovir dipivoxil (adefovirのプロドラッグ)などの核酸類似体による化学療法が中心となっている⁵⁹⁾。しかし、IFNの単独療法においては、血液中HBVDNA量やウイルス抗原の減少、肝酵素レベルの正常化、あるいはHBe抗原からHBe抗体へのセロコンバージョンなどの治療効果が20～30%の患者に限られること⁵⁹⁾、また、HBVのgenotypeにより抑制効果に差があることが問題となっている⁶⁰⁾。lamivudineやadefovir dipivoxilなどの核酸類似体療法においても、患者血液中のHBVDNA量などの減少が認められるが、長期投与による薬剤耐性株の出現が臨床上問題になっている^{61,62)}。このため、HBV感染症に対する新たな治療薬の開発が望まれる。

m-dsRNAはIFN誘導体として知られているが、マウスにおいてはIFN以外のリンフォカインの誘導やナチュラルキラー細胞の活性化を導くことが明らかにされている⁴⁷⁾。また、m-dsRNAと同類の2本鎖RNAであるpoly(I):poly(C)が選択的にHBV遺伝子の転写を阻害すると報告されている⁶³⁾。本研究においても、HBV感染モデルとして用いたDHBV感染アヒルに対してm-dsRNAが血液中のDHBVDNA量抑制作用を有することが明らかとなり、HBVに対しても同じ作用が期待できる。一方、健康人にm-dsRNAを投与した場合、IFNや2'-5'オリゴアデニル酸合成酵素などの有意な誘導活性が認められなかったという報告がある⁶⁴⁾。この報告においてm-dsRNAは約1時間かけて静脈内に投与されており、RNaseに対し高い感受性をもつm-dsRNAは、十分な活性を誘導する前にRNaseにより分解された可能性も推定される。今後の臨床試験の課題としてm-dsRNA投与量や投与方法などの検討が必要である。本研究においてm-dsRNAの投与量によるDHBV感染アヒルに対するDHBV抑制作用に差は認められなかった(Fig.11、12)。この結果から、m-dsRNAは0.2mg/kg以下の低用量でもDHBV感染アヒルに対し作用が期待できる可能性がある。

近年、小型哺乳類ツパイの肝細胞にHBVが自然感染することが明らかとなり、この感染実験系でlamivudineやadefovirの抗HBV活性が確認された⁶⁵⁾。この報告では、lamivudineとadefovirの併用により相乗的な抑制効果は認めなかった。これらの核酸類似体はウイルスDNA合成を同様な機序、すなわちウイルスの逆転写酵素阻害により抑制する。本研究においてm-dsRNAは主としてDHBV

RNA転写阻害を、一方、核酸類似体であるD-FMAUは主としてDHBVDNA複製阻害を示し(Fig.13、15)、両化合物のウイルス複製抑制機序が異なることが明らかにされた。m-dsRNA投与によりDHBV感染アヒルにおいてIFN活性と2'-5'オリゴアデニル酸合成酵素活性が認められたことから、m-dsRNAがDHBVRNA転写を阻害する機序の一つとして、IFNと2'-5'オリゴアデニル酸合成酵素誘導に続くRNaseL活性誘導によるウイルスmRNAの分解が推定される(Fig.3)。HBV感染者の治療法として化合物の併用投与を行う場合には、作用機序が異なる組み合わせが望ましい。実際、Demirturk⁶⁶⁾らはB型慢性肝炎に対してIFN- α とlamivudineの併用は、IFN- α とadefovirの併用より高い治療効果を示したと報告しており、Yalcin⁶⁷⁾らも、IFN- α の単独療法よりIFN- α とlamivudineの併用の方がB型慢性肝炎患者血液中のHBe抗原の減少率が高かったと報告している。しかし、一方で小児のB型肝炎患者において、IFN- α の単独療法とIFN- α とlamivudineの併用療法では治療効果は同じであったという報告もあり⁶⁸⁾、HBV感染者に対する化合物の併用療法に関しては、今後の詳細な研究が必要である。

本研究において、m-dsRNAとD-FMAUのDHBV複製抑制作用の持続性の相違が明らかにされた(Fig.10、11、14)。D-FMAUにはDHBVDNA複製の持続的な抑制作用が認められなかったが、m-dsRNAは*in vivo*、*in vitro*いずれにおいても投与中止後、少なくとも7日間は持続的にDHBVDNA複製を抑制した。この持続抑制には、2'-5'オリゴアデニル酸合成酵素活性の持続が影響している可能性がある。2'-5'オリゴアデニル酸合成酵素活性は*in vivo*の実験において、少なくとも48時間まで維持していた(Fig.9)。従って、肝細胞中に2'-5'オリゴアデニル酸が長時間蓄積され、RNaseLなどの誘導酵素がDHBVRNA転写阻害を維持し、結果的にDHBVDNA複製の持続的抑制をきたす可能性が推測される。HBV感染者においてもIFN投与により血液中に2'-5'オリゴアデニル酸合成酵素活性が認められ、この酵素活性の上昇がIFNのHBV抑制作用を反映していることが知られている^{69,70)}。しかし、Shindo⁶⁹⁾らは、IFN投与後の2'-5'オリゴアデニル酸合成酵素活性は12時間後に極値に達し、以後減少すると報告しており本研究の結果と異なる。Shindoらの検討は血液中あるいは末梢血の単球における酵素活性であり、ウイルス抑制作用の持続性との関連を明確にするには、肝細胞における2'-5'オリゴアデニル酸合成酵素活性および2'-5'オリゴアデニル酸合成量とウイルス抑制作用

との関連性を検討する必要がある。

核酸類似体であるD-FMAUにはm-dsRNAで得られた投与中止後の持続的なDHBV複製抑制作用は認められなかった。同じ成績が核酸類似体であるlamivudine投与のHBV感染者においても認められている⁷¹⁾。多くの核酸類似体は細胞内で宿主のキナーゼにより三リン酸化された後、ウイルスのポリメラーゼに対して本来の核酸基質と競合拮抗し、ウイルスDNA合成を阻害することにより抑制作用を示す^{43,72)}。従って、ウイルスDNAポリメラーゼや鋳型となるウイルスRNAが完全に除去されない限り、持続的な抗ウイルス活性は期待できない。

HBVのDNAポリメラーゼはレトロウイルスの逆転写酵素と同様に、DNA複製過程における読み違いが多く、また読み違いに対する修飾能力も有していないので多くのHBV変異株が形成されやすい^{73,74)}。その為、核酸類似体に対するウイルス耐性株が出現しやすい。実際、lamivudine療法を1年間続けると32%、4年間続けると66%に変異耐性株が出現する^{75,76,77)}。adefovirは48週間の投与では耐性株は出現しなかったが、それ以上の長期投与により耐性株が分離され、臨床上問題となっている^{78,79)}。しかし、lamivudineとadefovirに対する耐性株のHBVDNAポリメラーゼのアミノ酸配列の変異部位が異なるため、lamivudine耐性株はadefovirに対して感受性を示し、adefovir耐性株はlamivudineに対して感受性を示す。臨床においては2剤の化合物の併用の効果が期待される。

最近、mRNAを特異的に抑制するRNA interference (RNAi) が明らかにされている。RNAiは2本鎖RNAが誘発する配列特異的な遺伝子発現抑制様式で、線虫や植物でも認められており、最終的に標的となるmRNAを切断あるいは翻訳を抑制する⁸⁰⁾。このRNAiの手法を使用してHBV遺伝子が組み込まれたHepG2.2.2.15細胞において、HBVの蛋白合成を特異的に抑制したとの報告がある^{81,82)}。また、Ying⁸³⁾らは、特異的配列を有したRNAiはlamivudine耐性株HBVに対しても、その複製を72~98%抑制したと報告している。さらに、HBVDNA挿入プラスミドをマウスに注入した実験感染モデルにおいて、RNAi手法によりHBV蛋白合成が抑制されたと報告されている^{84,85)}。本研究においてm-dsRNAもウイルスRNAを標的として持続的な抗ウイルス活性を有することが明らかにされ、その有用性が示されたが、m-dsRNAによる抑制は非特異的であり、今後、特異的にウイルスのmRNAを阻害するRNAi手法の臨床応用に興味を持たれる。

臨床におけるHBV感染の治療は未だ充分でなく、特異的配列を有するRNAiなどの新たな治療方法の開発が必要である。また、IFN及びm-dsRNA、異なる構造式をもつ核酸類似体など、これらを組み合わせて使用することにより、各化合物の副作用を軽減し、かつ相乗的、相加的なHBV治療効果の向上が期待される。今後、更なる研究が望まれる。

総 括

本研究において、m-dsRNAのDHBV複製に対する抑制作用を検討し、以下の結論を得た。

1、m-dsRNAはDHBV持続感染アヒルとDHBV感染アヒル初代肝培養細胞においてDHBVDNA複製の抑制作用を有することが明らかとなった。

2、m-dsRNA投与によりDHBV感染アヒルの末梢血液中にIFNおよび2'-5'オリゴアデニル酸合成酵素の活性が認められた。IFN活性は一過性であったが、2'-5'オリゴアデニル酸合成酵素活性は少なくとも48時間は持続した。

3、m-dsRNAの連続投与によりDHBV持続感染アヒルおよびDHBV感染アヒル初代肝培養細胞において、DHBVDNA複製が持続的に抑制された。D-FMAU投与によってもm-dsRNAに比べ強いDHBVDNA複製の抑制が得られたが、持続的抑制は認められなかった。

4、m-dsRNAは主としてDHBVRNA転写阻害を、D-FMAUは主としてDHBVDNA複製阻害をきたす事が明らかとなった。

謝 辞

本稿を終えるに当たり、本研究及び本論文提出の機会を賜り、並びに多大なご指導、ご鞭撻を賜わり、さらに本論文のご校閲を頂きました三田村圭二先生に謹んで感謝申し上げます。

さらに、本研究の機会を賜りました島田馨先生、並びに本論文提出を快く受諾頂きました東京大学医科学研究所先端医療研究センター長感染症分野教授、岩本愛吉先生に心より感謝申し上げます。

本研究にご助言とご鞭撻を終始賜りました町田治彦博士、井田節子博士に心より感謝申し上げます。また、本研究に際し、研究機会とご支援、ご協力を賜りましたヤマサ醤油株式会社 名誉研究所長國中明博士に心よりお礼申し上げます。

本研究に際し、ご支援とご協力を賜りましたヤマサ醤油株式会社 生物研究室の皆様、並びに東京大学医科学研究所感染症研究部の皆様に心より感謝申し上げます。

本論文の作成に当たり、ご意見、ご助言を賜りました東京大学医学部 小池和彦教授、野本明男教授、河岡義裕教授、俣野哲郎助教授、森屋恭爾講師諸先生に心より感謝申し上げます。

参考文献

- 1) Toillais P, Pourcel C, Dejean A.: The hepatitis B virus. *Nature* **317**: 489-495. (1985)
- 2) Hoofnagle JH., Shafritz DA., Popper H.: Chronic type B hepatitis and the “healthy” HBsAg carrier state. *Hepatology* **7**: 758-763. (1987)
- 3) Popper H, Shafritz DA, Hoofnagle JH.: Relation of the hepatitis B virus carrier state to hepatocellular carcinoma. *Hepatology* **7**: 764-772. (1987)
- 4) Kao JH., Chen DS.: Global control of hepatitis B virus infection. *Lancet Infect Dis.* **2**: 395-403. (2002)
- 5) Summers J, Smolec M, Snyder RA.: A viral Similar to human hepatitis B virus associated with hepatitis and hepatoma in woodchucks. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **75**: 4533-4537. (1978)
- 6) Marion PL., Knight SS., Salazar FH., Popper H., Robinson WS.: Ground squirrel hepatitisvirus infection. *Hepatology* **3**: 519-527. (1983)
- 7) Sprengel R, Kuhn C, Will H, Schaller H.: Comparative sequence analysis of duck and human hepatitis B virus genomes. *J. Med. Virol.* **15**: 323-333. (1985)
- 8) Mason WS., Seal G, Summers J.: Virus of pekin ducks with structural and biological relatedness to human hepatitis B virus. *J. Virol.* **36**: 829-836. (1980)
- 9) Zuckerman AJ.: Screening of antiviral drugs for hepadnavirus infection in Peking ducks: a review. *J. Virol. Methods* **17**: 119-126. (1987)
- 10) Hirota K, Sherker AH, Omata M, Yokosuka O, Okuno K.: Effects of adenine arabinoside on serum and intrahepatic replicative forms of duck hepatitis B virus in chronic infection.. *Hepatology* **7**: 24-28. (1987)
- 11) Lee B, Luo W, Suzuki S, Robins MJ, Tyrrell DJ.: *In vitro* and *in vivo* comparison of the abilities of purine and pyrimidine 2',3'-dideoxynucleosides to inhibit duck hepadnavirus. *Antimicrob. Agents Chemother.* **33**: 336-339. (1989)

- 12) Fourel I, Li J, Hantz O, Jacquet C, Fox JJ, Trepo C.: Effects of 2'-fluorinated arabinosyl-pyrimidine nucleosides on duck hepatitis B virus DNA level in serum and liver of chronically infected ducks. *J. Med. Virol.* **37**: 122-126. (1992)
- 13) Bavand MR, and Laub O.: Two proteins with reverse transcriptase activities associated with hepatitis B virus-like particles. *J Virol.* **62**: 626-628. (1988)
- 14) Toh H., Hayasida H., Miyata T.: Sequence homology between retroviral reverse transcriptase and putative polymerases of hepatitis B virus and cauliflower mosaic virus. *Nature* **305**: 827-829. (1983)
- 15) Summers J, Mason WS.: Replication of the genome of a hepatitis B--like virus by reverse transcription of an RNA intermediate. *Cell.* **29**: 403-415. (1982)
- 16) Miller RH., Robinson WS.: Common evolutionary origin of hepatitis B virus and retroviruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **83**: 2531-2535. (1985)
- 17) Will H.: Replication strategy of human hepatitis B virus. *J. Virol.* **61**: 904-911. (1987)
- 18) Ganem D, Varnus HE.: The molecular biology of the hepatitis B viruses. *Annu. Rev. Biochem.* **56**: 651-693.(1987)
- 19) Robinson WS., Miller RH, Marion PL.: Hepadnaviruses and retroviruses share genome homology and features of replication. *Hepatology* **7**: 645-735. (1987)
- 20) Greenberg HB, Pollard RB, Lutwick LI, Gregory PB, Robinson WS, Merigan TC.: Effect of human leukocyte interferon on hepatitis B virus infection in patients with chronic active hepatitis. *N. Engl. J. Med.* **295**: 517-522. (1976)
- 21) Yokosuka O, Omata M, Imazeki F, Okuda K.: Changes of hepatitis B virus DNA in liver and serum caused by recombinant leukocyte interferon treatment: analysis of intrahepatic replicative hepatitis B virus DNA. *Hepatology* **5**: 728-734. (1985)

- 22) Alberti A, Fattovich G, Pontisso P, Brollo L, Belussi F, Ruol A.: Interferon treatment of anti-HBe positive and HBV DNA positive chronic hepatitis B. *Chemioterapia. Suppl* **3**: 15-19. (1988)
- 23) Severini A, Liu XY, Wilson JS, Tyrrell DL.: Mechanism of inhibition of duck hepatitis B virus polymerase by (-)-beta-L-2',3'-dideoxy-3'-thiacytidine. *Antimicrob. Agents Chemother.* **39**: 1430-1435. (1995)
- 24) Dienstag JL, Perrillo RP, Schiff ER, Bartholomew M, Vicary C, Rubin M.: A preliminary trial of lamivudine for chronic hepatitis B infection. *N. Engl. J. Med.* **333**: 1657-1661. (1995)
- 25) Nicoll AJ, Colledge DL, Toole JJ, Angus PW, Smallwood RA, Locarnini SA.: Inhibition of duck hepatitis B virus replication by 9-(2-phosphonylmethoxyethyl)adenine, an acyclic phosphonate nucleoside analogue. *Antimicrob. Agents Chemother.* **42**: 3130-3135. (1998)
- 26) Gilson RJ, Chopra KB, Newell AM, Murray-Lyon IM, Nelson MR, Rice SJ, Tedder RS, Toole J, Jaffe HS, Weller IV.: A placebo-controlled phase I/II study of adefovir dipivoxil in patients with chronic hepatitis B virus infection. *J. Viral. Hepat.* **6**: 387-395. (1999)
- 27) Serfaty L, Thabut D, Zoulim F, Andreani T, Chazouilleres O, Carbonell N, Loria A, Poupon R.: Sequential treatment with lamivudine and interferon monotherapies in patients with chronic hepatitis B not responding to interferon alone: results of a pilot study. *Hepatology* **34**: 573-577. (2001)
- 28) Lengyel P, Samanta H, Pichon J, Dougherty J, Slattery E, Farrell P.: Double-stranded RNA and the enzymology of interferon action. *Ann. N Y Acad. Sci.* **350**: 441-7. (1980)
- 29) Nilsen TW, Weissman SG, Baglioni C.: Role of 2',5'-oligo(adenylic acid) polymerase in the degradation of ribonucleic acid linked to double-stranded ribonucleic acid by extracts of interferon-treated cells. *Biochemistry* **19**: 5574-5579. (1980)
- 30) Banerjee S, An S, Zhou A, Silverman RH, Makino S.: RNase L-independent specific 28S rRNA cleavage in murine coronavirus-infected cells. *J. Virol.* **74**: 8793-8802. (2000)

- 31) Kimball SR.: Eukaryotic initiation factor eIF2. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 31: 25–29. Review. (1999)
- 32) Sells MA., Chen M.-L, Acs G.: Production of hepatitis B virus particles in Hep G2 cells transfected with cloned hepatitis B virus DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 84: 1005–1009. (1987)
- 33) Tsurimoto T, Fujiyama A, Matsubara K.: Stable expression and replication of hepatitis B virus genome in an integrated state in human hepatoma cell line transfected with the cloned viral DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 84: 444–448. (1987)
- 34) Yokota T, Mochizuki S, Konno K, Mori S, Shigeta S, De Clercq E.: Inhibition effects of selected antiviral compounds on human hepatitis B virus DNA synthesis. *Antimicrob. Agents Chemother.* 35: 394–397. (1991)
- 35) Balakrishna Pai S, Liu SH, Zhu YL, Chu CK, Cheng YC.: Inhibition of hepatitis B virus by a novel L-nucleoside, 2'-fluoro-5-methyl-beta-L-arabinofuranosyl uracil. *Antimicrob. Agents Chemother.* 40: 380–386. (1996)
- 36) Yokota T, Konno K, Chonan E, Mochizuki S, Kojima K, Shigeta S, De Clercq E.: Comparative activities of several nucleoside analogs against duck hepatitis B virus in vitro. *Antimicrob. Agents Chemother.* 34: 1326–1330. (1990)
- 37) Fourel I, Li J, Hantz O, Jacquet C, Fox JJ, Trepo C.: Effects of 2'-fluorinated arabinosyl-pyrimidine nucleosides on duck hepatitis B virus DNA level in serum and liver of chronically infected ducks. *J. Med. Virol.* 37: 122–126. (1992)
- 38) Schroder I, Holmgren B, Oberg M, Lofgren B.: Inhibitory effect of 2'-fluoro-5-methyl-beta-L-arabinofuranosyl-uracil on duck hepatitis B virus replication. *Antimicrob. Agents Chemother.* 42: 369–376. (1998)

- 39) Zoulim F, Dannaoui E, Borel C, Hantz O, Lin TS, Liu SH, Trepo C, Cheng YC.: 2',3'-dideoxy-beta-L-5-fluorocytidine inhibits duck hepatitis B virus reverse transcription and suppresses viral DNA synthesis in hepatocytes, both in vitro and in vivo. *Antimicrob. Agents Chemother.* **40**: 448-453. (1996)
- 40) Offensperger WB, Offensperger S, Keppler-Hafkemeyer A, Hafkemeyer P, Blum HE.: Antiviral activities of penciclovir and famciclovir on duck hepatitis B virus in vitro and in vivo. *Antivir. Ther.* **1**: 141-146. (1996)
- 41) Delmas J, Schorr O, Jamard C, Gibbs C, Trepo C, Hantz O, Zoulim F.: Inhibitory effect of adefovir on viral DNA synthesis and covalently closed circular DNA formation in duck hepatitis B virus-infected hepatocytes in vivo and in vitro. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**: 425-33. (2002)
- 42) Seigneres B, Martin P, Werle B, Schorr O, Jamard C, Rimsky L, Trepo C, Zoulim F.: Effects of pyrimidine and purine analog combinations in the duck hepatitis B virus infection model. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**: 1842-1852. (2003)
- 43) Zoulim F, Berthillon P, Guerhier FL, Seigneres B, Germon S, Pichoud C, Cheng YC, Trepo C.: Animal models for the study of HBV infection and the evaluation of new anti-HBV strategies. *J. Gastroenterol. Hepatol.* **17**: 460-463. (2002)
- 44) Lin TS, Luo MZ, Liu MC, Pai SB, Dutschman GE, Cheng YC.: Synthesis and biological evaluation of 2',3'-dideoxy-L-pyrimidine nucleosides as potential antiviral agents against human immunodeficiency virus (HIV) and hepatitis B virus (HBV). *J. Med. Chem.* **37**: 798-803. (1994)
- 45) Lee K, Choi Y, Gullen E, Schlueter-Wirtz S, Schinazi RF, Cheng YC, Chu CK.: Synthesis and anti-HIV and anti-HBV activities of 2'-fluoro-2', 3'-unsaturated L-nucleosides. *J. Med. Chem.* **42**: 1320-1328. (1999)

- 46) Zarling JM, Schlais J, Eslera L, Greene JJ, Ts'o POP, Carter WA.: Augmentation of human natural killer cell activity by polyinosinic acid-polycytidylic acid and its nontoxic mismatched analogues. *J. Immunol.* **124**: 1852-1857. (1980)
- 47) Carter WA, Strayer DR, Hubbell HR, Brodsky I.: Preclinical studies with ampligen (mismatched double-stranded RNA). *J. Biol. Response Mod.* **4**: 495-502. (1985)
- 48) Hubbell HR, Boyer JE, Roane P, Burch RM.: Cyclic AMP mediates the direct antiproliferative action of mismatched double-stranded RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **88**: 906-910. (1991)
- 49) Hubbell HR, Vargas HE, Tsujimoto KL, Gibson GD, Pequignot EC, Bigler RD, Carter WA, Strayer DR.: Antitumor effects of interleukin-2 and mismatched double-stranded RNA, individually and in combination, against a human malignant melanoma xenograft. *Cancer Immunol. Immunother.* **5**: 151-157. (1992)
- 50) Montefiori DC, Pellegrino MG, Robinson WE Jr, Engle K, Field M, Mitchell WM, Gillespie DH.: Inhibition of HIV-1 proviral DNA synthesis and RNA accumulation by mismatched dsRNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **158**: 943-950. (1989)
- 51) Montefiori DC, Mitchell WM.: Antiviral activity of mismatched double-stranded RNA against human immunodeficiency virus in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **84**: 2985-2989. (1987)
- 52) Lin B, Anderson DA.: A vestigial X open reading frame in duck hepatitis B virus. *Intervirology.* **43**: 185-190. (2000)
- 53) 戸田剛太郎、滝川一、小池和彦(編集): ここまできた肝の科学. 中外医学社 (2002)
- 54) Uchida T, Suzuki K, Esumi M, Arii M, Oomura M, Shikata T.: Occurrence and ultrastructural localization of duck hepatitis B virus in the liver of ducks after experimental infection. *Hepatology* **7**: 29-36. (1987)
- 55) Scotto J, Hadchouel M, Hery C, Yvart J, Tiollais P, Brechot C.: Detection of hepatitis B virus DNA in serum by a simple spot hybridization technique: comparison with results for other viral markers. *Hepatology.* **3**: 279-284. (1983)

- 56) Southern E. M.: Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* **98**: 503–517. (1975)
- 57) Tuttleman JS, Pugh JC, Summers JW.: In vitro experimental infection of primary duck hepatocyte cultures with duck hepatitis B virus. *J. Virol.* **58**: 17–25. (1986)
- 58) Chomyczynski P, Sacchi N.: Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-PhOH-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* **162**: 156–159. (1987)
- 59) Karayiannis P.: Hepatitis B virus: old, new and future approaches to antiviral treatment. *J Antimicrob. Chemother.* **51**: 761–785. (2003)
- 60) Wai CT, Chu CJ, Hussain M, Lok AS.: HBV genotype B is associated with better response to interferon therapy in HBeAg (+) chronic hepatitis than genotype C. *Hepatology.* **36**: 1425–1430. (2002)
- 61) Marcellin P.: Advances in therapy for chronic hepatitis B. *Semin. Liver* **22**: 33–36. (2002)
- 62) Angus P, Vaughan R, Xiong S, Yang H, Delaney W, Gibbs C, Brosgart C, Colledge D, Edwards R, Ayres A, Bartholomeusz A, Locarnini S.: Resistance to adefovir dipivoxil therapy associated with the selection of a novel mutation in the HBV polymerase. *Gastroenterology.* **125**: 292–297. (2003)
- 63) Banerjee R, Price PM, Sung MW, Karpen S, Acs G.: Selective inhibition of hepatitis B virus and human immunodeficiency virus sequence-promoted gene expression by cotransfected poly(I):poly(C). *Virology.* **179**: 410–415. (1990)
- 64) Hendrix CW, Margolick JB, Petty BG, Markham RB, Nerhood L, Farzadegan H, Ts'o PO, Lietman PS.: Biologic effects after a single dose of poly(I):poly(C₁₂U) in healthy volunteers. *Antimicrob. Agents Chemother.* **37**: 429–435. (1993)
- 65) Kock J, Baumert TF, Delaney WE 4th, Blum HE, von Weizsacker F.: Inhibitory effect of adefovir and lamivudine on the initiation of hepatitis B virus infection in primary tupaia hepatocytes. *Hepatology.* **38**: 1410–1418. (2003)
- 66) Demirturk N, Usluer G, Ozgunes I, Colak H, Kartal ED, Dincer S.: Comparison of different

- treatment combinations for chronic hepatitis B infection. *J. Chemother.* **14**: 285–289. (2002)
- 67) Yalcin K, Degertekin H, Yildiz F, Celik Y.: Comparison of 12-month courses of interferon- α -2b-lamivudine combination therapy and interferon- α -2b monotherapy among patients with untreated chronic hepatitis B. *Clin Infect. Dis.* **36**: 1516–1522. (2003)
- 68) Selimoglu MA, Aydogdu S, Unal F, Zeytinoglu A, Yuce G, Yagci RV.: Alpha interferon and lamivudine combination therapy for chronic hepatitis B in children. *Pediatr. Int.* **44**: 404–408. (2002)
- 69) Shindo M, Okuno T, Matsumoto M, Takeda M, Takino T, Sokawa J, Iwata A, Sokawa Y.: Serum 2',5'-oligoadenylate synthetase activity during interferon treatment of chronic hepatitis B. *Hepatology.* **8**: 366–370. (1988)
- 70) Karino Y, Sugawara T, Saga A, Yoshida J, Matsushima T, Miyazaki T, Toyota J, Okuuchi Y.: Serum 2'-5'-oligoadenylate synthetase as a monitoring marker of anti-viral effect during interferon therapy for chronic type B hepatitis. *Gastroenterol. Jpn.* **24**: 164–169. (1989)
- 71) Hagmeyer KO, Pan YY.: Role of lamivudine in the treatment of chronic hepatitis B virus infection. *Ann. Pharmacother.* **33**: 1104–1112. (1999)
- 72) Wolters LM, Niesters HG, de Man RA.: Nucleoside analogues for chronic hepatitis B. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* **13**: 1499–1506. Review. (2001)
- 73) Locarnini S, Birch C.: Antiviral chemotherapy for chronic hepatitis B infection: lessons learned from treating HIV-infected patients. *J. Hepatol.* **30**: 536–550. Review. (1999)
- 74) Stuyver L, Van Geyt C, De Gendt S, Van Reybroeck G, Zoulim F, Leroux-Roels G, Rossau R.: Line probe assay for monitoring drug resistance in hepatitis B virus-infected patients during antiviral therapy. *J. Clin. Microbiol.* **38**: 702–707. (2000)

- 75) Lai CL, Chien RN, Leung NW, Chang TT, Guan R, Tai DI, Ng KY, Wu PC, Dent JC, Barber J, Stephenson SL, Gray DF.: A one-year trial of lamivudine for chronic hepatitis B. *N. Engl. J. Med.* **339**: 61-68. (1998)
- 76) Dienstag JL, Schiff ER, Wright TL, Perrillo RP, Hann HW, Goodman Z, Crowther L, Condeary LD, Woessner M, Rubin M, Brown NA.: Lamivudine as initial treatment for chronic hepatitis B in the United States. *N. Engl. J. Med.* **341**: 1256-1263. (1999)
- 77) Leung NW, Lai CL, Chang TT, Guan R, Lee CM, Ng KY, Lim SG, Wu PC, Dent JC, Edmundson S, Condeary LD, Chien RN: Extended lamivudine treatment in patients with chronic hepatitis B enhances hepatitis B e antigen seroconversion rates: results after 3 years of therapy. *Hepatology.* **33**: 1527-1532. (2001)
- 78) Angus P, Vaughan R, Xiong S, Yang H, Delaney W, Gibbs C, Brosgart C, Colledge D, Edwards R, Ayres A, Bartholomeusz A, Locarnini S.: Resistance to adefovir dipivoxil therapy associated with the selection of a novel mutation in the HBV polymerase. *Gastroenterology.* **125**: 292-297. (2003)
- 79) Villeneuve JP, Durantel D, Durantel S, Westland C, Xiong S, Brosgart CL, Gibbs CS, Parvaz P, Werle B, Trepo C, Zoulim F.: Selection of a hepatitis B virus strain resistant to adefovir in a liver transplantation patient. *J. Hepatol.* **39**: 1085-1089. (2003)
- 80) 塩見美喜子、石塚明：蛋白質 核酸 酵素. **48**: 1632-1637. (2003)
- 81) Shlomai A, Shaul Y.: Inhibition of hepatitis B virus expression and replication by RNA interference. *Hepatology.* **37**: 764-770. (2003)
- 82) Konishi M, Wu CH, Wu GY.: Inhibition of HBV replication by siRNA in a stable HBV-producing cell line. *Hepatology.* **38**: 842-850. (2003)
- 83) Ying C, De Clercq E, Neyts J.: Selective inhibition of hepatitis B virus replication by RNA interference. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **309**: 482-484. (2003)

- 84) Giladi H, Ketzinel-Gilad M, Rivkin L, Felig Y, Nussbaum O, Galun E.: Small interfering RNA inhibits hepatitis B virus replication in mice. *Mol. Ther.* **8**: 769–776. (2003)
- 85) Klein C, Bock CT, Wedemeyer H, Wustefeld T, Locarnini S, Dienes HP, Kubicka S, Manns MP, Trautwein C.: Inhibition of hepatitis B virus replication in vivo by nucleoside analogues and siRNA. *Gastroenterology*. **125**: 9–18. (2003)