

## ワクチン創製の新テクノロジーと新規ワクチンの開発

所 属 国立感染症研究所 感染病理部  
研 究 者 小 島 朝 人

### 分担研究者

- |                         |       |
|-------------------------|-------|
| (1) 国立感染症研究所感染病理部       | 小島 朝人 |
| (2) (財)阪大微生物病研究会 観音寺研究所 | 東 雍   |
| (3) 大阪大学医学部             | 山西 弘一 |

### 要 旨

①脳材料を用いない培養Vero細胞由来の新不活化JEワクチン開発において、試作製造したワクチン原液は保存剤無しで抗原含量及び力価とも非常に安定であった。しかし、希釈液状ワクチンではチメロサルに代わる保存剤開発が求められた。有効性試験で現行ワクチンと同等かそれ以上のワクチン効果が示されたことから、新ワクチン実現が更に近づいた。②WHOが求める理想の次世代ワクチン開発では、樹立したJEV抗原持続産生J12#26細胞株の無血清培地馴化にも成功し、培養上清から精製したJ12#26抗原が、現行ワクチンと同等以上のワクチン効果を示した(特願2002-229597:日本脳炎抗原及びその製造方法)。この想定以上の成果により、理想の新規JEワクチン実現性が一層高まったため、今後は当初計画の研究焦点をまだワクチンの存在しない他のフラビワクチン開発に変更する。③DNAワクチン開発を目的にクローニングされたHHV-6 MIEプロモーターが、リンパ系細胞でHCMV-IEプロモーターの数倍の発現活性を示した。しかし、発現遺伝子をJEVの外皮糖蛋白遺伝子に変換するとその活性が検出されなかったため、原因の解明を進めている。

### 1. 研究目的

アジアでは日本脳炎の大流行が依然として続き、毎年35,000名を越える患者発生がWHOに報告されている。我国での日本脳炎患者発生は少ないものの、約10年前沖縄県で大規模な演習を行った米軍関係者に6名(当時の米軍および軍属約2万名)の患者が発生した。このことは、日本脳炎ワクチン接種歴がなく基礎免疫の無い人は発症の危険性が極めて高いことを示している。また、我国への再侵襲を防ぐ意味でも、流行アジア地域を含めた総合的な予防対策の必要性を示している。しかし、現在世界中で日本脳炎ウイルス(JEV)感染マウス脳を材料とする精製不活化ワクチンしか存在しない。有効性・安全性とも優れたワクチンであるが、脳材料を用いることに由来する懸念は否定できない。それ故、脳不使用の新ワクチン開発が急務であり、WHOは世界各国に対して緊急の課題として要請していた。

本課題では、脳材料不使用ワクチンとして既に開発が進行していた、ATCC由来Vero細胞のマイクロキャリア大量培養法で増殖させたJEV北京-1株を原材料とする新しい不活化日本脳炎ワクチンを、コントロールされた材料と方法で計画的に製造できる方法の確立を目指してきた。既に、製造スケールで試験用ワクチンを試作したが、今後の新規開発ワクチンには安定・保存剤としてチメロサールの使用が認められなくなった。従って、新安定・保存剤の開発、安定な液状製剤の開発は、冷蔵庫・冷凍庫設備の不十分な地域でのワクチン接種を効率化し、財政負担を招く高コストを避けるには重要な問題となる。そこで、製造した試作ワクチンに各種安定剤・保存剤を添加した液状ワクチンを各種試作し、安定性を検討した。また、新ワクチンの有効性を検討するため、致死量以上のウイルス感染実験を実施し、ワクチン効果を現行ワクチンと比較した。

このように、細胞培養由来JEVを不活化した脳材料不使用の新ワクチンが研究グループの阪大微研会により開発されつつある。そこで次なる目標は当然ながら、ウイルスを用いない・製造工程の安全なワクチン創製の新技術開発と、これによる新世代ワクチン開発である。しかし、JEVの表面糖蛋白は細胞にtoxicなため、日欧米で進められているゲノムテクノロジーを用いた大量発現細胞株樹立の試みも、ワクチン製造に十分な抗原産生量が得られず、未だ不首尾である。この点我々は、JEVの3' C-prM-E cDNA(J12)を用いて、中和抗原粒子を高発現する持続産生J12#26細胞株の樹立に成功した。そこで、この細胞株培養上清から精製したJ12#26抗原の抗原性解析と、マウスを用いた中和抗体誘導試験・感

染防御試験を実施し、WHOが理想とする、製造にウイルスを用いない・安価な新規ワクチン開発を目指した。また、牛血清の混入可能性を排除するため、無血清培地への細胞株馴化を行い、精製抗原の有効性を現行ワクチンと比較した。

一方、新テクノロジーとして着目されているものの未だ実現例の無いDNAワクチン開発においては、強力な発現プロモーターが必要不可欠である。現在までの事例では、ヒトサイトメガロウイルス(HCMV)の前初期(IE)プロモーターがDNAワクチンに汎用されている。その根拠は、HCMV IEプロモーターが一般的に種々の細胞において強い活性を示すと考えられていることによる。しかし、リンパ球系細胞での発現効率が低いことや、メチル化による不活化等の現象が見られることも他方では報告されている。また、HCMV IEプロモーターのDNAワクチンへの利用については、特許等の制約が実現性を抑制している問題点もある。我々はこれまでの研究で、HCMVと同じヒトヘルペスウイルス属βウイルス亜科に属するHHV-6の主要前初期遺伝子(MIE)のプロモーターが強い活性を示すことを明らかにしている。そこで、このMIE遺伝子プロモーターのDNAワクチンへの利用可能性について検討を行った。

## 2. 研究方法

### (1) Vero細胞を用いた不活化日本脳炎ワクチンの開発

ATCCから購入したVero細胞を用いて確立したセルバンクシステム、北京-1株を用いて確立したシードロットを使用して、製造スケールで連続3ロットのワクチン原液を製造した。ワクチンの製造方法は、マイクロキャリアで増殖したVero細胞に種ウイルスを接種し、牛血清不含培養液で培養した後、培養上清を採取した。このウイルス浮遊培養液を濃縮し、ホルマリンでウイルスを不活化後、硫酸プロタミン処理を行った。さらに、蔗糖密度勾配遠心法で繰り返し2回精製した後、ウイルス画分を透析、濾過してワクチン原液とした。原液を臨床使用時の予定希釈濃度に調製し、チメロサルに代えて2-Phenoxyethanol等の保存剤を添加後小分けし、試作ワクチンとした。試作品を4℃、25℃又は37℃に保存し、定期的にJEV抗原含量と力価を測定した。抗原含量は、抗-JEVモノクローナル抗体(東京都神経科学総合研究所;保井孝太郎博士より分与:Group-8 Clone503)を用いたサンドイッチELISA法で測定した。力価は生物学的製剤基準 日本脳炎ワクチンの力価試験法に準じて測定した。有効性は2種の感染攻撃試験で生存率を検討した。試験1)3.5週齢雌ddYマウス皮下に4倍階段希釈したワクチン0.5mlを7日間隔で2回接種し、7日目にJEV北京-1株を静脈内(32 LD<sub>50</sub>:1.3×10<sup>8</sup> PFU/マウス)、腹腔内(5.0 LD<sub>50</sub>:6.5×10<sup>8</sup> PFU/マウス)攻撃し、21日間観察した。試験2)3週齢雌ddYマウスにVero細胞由来新ワクチン、現行ワクチン及びJaTH160株不活化ワクチンで免疫したマウス血清の4倍階段希釈を0.2ml皮下接種した。翌日各群5匹から全採血し中和抗体価を測定した。残りのマウスを2等分し、8又は804LD<sub>50</sub>のJaTH160株で腹腔内攻撃した。生存率と移行抗体価から受動免疫による発症防御能を比較した。

### (2) 中和抗原粒子持続産生J12#26細胞株を用いた新世代日本脳炎ワクチンの開発

JEV prM-E領域のcDNA、J12を高い効率で発現するJ12#26持続細胞は既に報告した株を用いた。無血清培地への馴化はFBS濃度を20継代期間に1/2づつ順次低下させた。細胞の継代には10%FBS添加MEM培地及びVP-SFM無血清培地を用いた。J12#26細胞内に発現されたJ12#26蛋白の抗原性は、細胞をアセトン固定後、JEV中和エピトープ503、No4モノクローナル抗体及びウサギ抗-JEVポリクローナル抗体を用いた蛍光抗体法で検討した。また、2.5%グルタルアルデヒドで前固定した細胞の薄切標本を透過型電子顕微鏡で観察した。培養上清中のJ12#26抗原は既に報告した方法、或いは、今回新たに確立したSephacryl S-300、Sephadex G-25ゲル濾過、蔗糖密度勾配遠心を組合わせた方法で精製した。抗原の凝集(HA)活性は定法に従って測定した。抗原解析は、現行ワクチン精製不活化JEVを標準抗原として、JEV中和503モノクローナル抗体を用いたサンドイッチELISA、ウサギ抗-JEV抗体を用いたウエスタンブロットで行った。精製抗原の形状はネガティブ染色後電子顕微鏡で観察した。中和抗体誘導試験は、6週齢雌マウスの腹腔に現行試験法に準じて、ELISA抗原価或いは蛋白量で現行ワクチンと当量のJ12#26精製抗原を1週間隔で2回投与した。投与後1~7週まで血清を採取し、Vero細胞を用いたブランク法でJEV北京株に対する中和抗体価を測定した。感染防御試験には4週齢雌マウスを用いた。中和抗体誘導試験と同様に2回免疫したマウスの6週齢時に、50LD<sub>50</sub>のJEVを腹腔接種し、マウスの生死を3週間観察して生存率を求めた。

### (3) HHV-6Bプロモーターの探索とDNAワクチンの開発

HHV-6BのMIE遺伝子のプロモーター領域(約1.2kbp)をクローニングし、さらにその下流に日本脳炎ウイルス北京-1株の外皮糖蛋白遺伝子cDNAを連結したプラスミド(p9u/JEVenv)を構築した。また、

pCDNA3.1 Zeo+ベクターのHCMV-IEプロモーター下流にJEVenvを連結したプラスミド(pCDNA3.1/JEVenv)を対照に構築した。緑色蛍光蛋白発現プラスミドpEGFP-N1は市販のものを使用した。また、ルシフェラーゼ発現プラスミドは既に構築したものをを用いた。これらプラスミドを293細胞(ヒト腎臓由来)、Vero細胞(サル腎臓由来)、SupT1細胞(ヒトTリンパ球由来)、U937細胞(ヒト単球由来)等にリポフェクション法で導入した。細胞内での外皮糖蛋白の発現は、抗-JEVポリクローナル抗体を用いた間接蛍光抗体法、細胞抽出液のウエスタンブロット法で検討した。

### 3. 研究成果

#### (1) Vero細胞を用いた不活化日本脳炎新ワクチンの開発

3ロットのワクチン原液は、リン酸緩衝食塩液を溶媒とし、安定剤にアミノ酸を添加して4℃に保存した。この条件で約2年間保存してもJEV抗原含量は80%以上の値を示し、力価の低下もほとんど認められなかった。また、25℃で6ヶ月間保存しても力価の低下は認められなかった。添加剤にTween80を50 $\mu$ g/mlまたは2-Phenoxyethanolを0.3%添加した試作ワクチンを37℃で7日間保存したとき、無添加に比べてTween80添加ワクチンはJEV抗原含量及び力価ともやや低下が認められ、Tween80及び2-Phenoxyethanolの添加ワクチンでは抗原含量・力価とも低下が顕著であった。さらに、Tween80を50 $\mu$ g/mlと2-Phenoxyethanolを0.3%添加した試作ワクチンの25℃、37℃4週間保存試験では、蛋白質含量は変化しなかった。しかし、JEV抗原含量は25℃保存で低下しなかったものの、力価は2週間で1/7~1/11に低下し、4週間では1/9~1/15に低下した。また、37℃-4週間保存ではJEV抗原含量が約1/2に低下し、力価は1/33~1/191に低下した。各温度に保存した試作ワクチンのJEV抗原含量と抗原力価は相関する傾向が認められた。

試作ワクチンの有効性を判定するため、ワクチン免疫マウスの感染防御効果を検討した。その結果、JEV北京-1株静脈内攻撃に対する50%発症防御有効量(ED<sub>50</sub>)は現行ワクチンが4<sup>4.00</sup>(256倍)であったのに対して、試作ワクチンは4<sup>4.51</sup>(519倍)であった。一方、腹腔内攻撃の場合には、試作ワクチンのED<sub>50</sub>は4<sup>4.65</sup>(630倍)で、現行ワクチンでは4<sup>4.68</sup>(656倍)であった。次に、ワクチン接種で誘導された抗体による受動免疫効果を検討した。各種不活化JEVワクチンで免疫したマウスの血清を、未免疫マウスの皮下に接種して受動免疫した。受動免疫翌日のマウス血中の中和抗体価は、接種血清の抗体価と相関したが、高い抗体価の血清程、受動抗体価の低下は大きくなる傾向を示した。これらマウスを804LD<sub>50</sub>(高濃度攻撃)又は8LD<sub>50</sub>(低濃度攻撃)のJaTH160株で攻撃し、受動中和抗体価とウイルス攻撃後の生残率からED<sub>50</sub>(発症を50%防御する中和抗体価)を算出した。その結果、高濃度攻撃に対するED<sub>50</sub>は、試作ワクチンの免疫抗体で10<sup>1.05</sup>(11倍)、現行ワクチンは10<sup>1.45</sup>(28倍)、JaTH株ワクチンでは10<sup>1.13</sup>(13倍)であった。また、低濃度攻撃に対する試作ワクチンの免疫抗体は10<sup>1.20</sup>(16倍)、現行ワクチンは10<sup>1.43</sup>(27倍)、JaTH株ワクチンでは10<sup>1.11</sup>(13倍)であった。

#### (2) 中和抗原粒子持続産生J12#26細胞株を用いた新世代日本脳炎ワクチンの開発

J12cDNAを導入したJ12#26細胞株は増殖速度がやや低下するものの、形態は未導入親株と全く変化が無く、細胞接着阻害も正常に生じた。中和モノクローナル抗体503およびNo.4によって細胞質が明瞭に染色され、抗-JEVポリクローナル抗体でも同様の染色像を示した。電子顕微鏡観察では、ゴルジ体の小胞内に直径約20nmの電子密度の高い小型球形粒子構造が認められ、ベクターDNA導入細胞では観察されなかった。J12#26細胞培養上清からPEG沈殿・蔗糖密度勾配遠心・Sephadexカラムゲルろ過で精製したJ12#26抗原は、分子量53kDaのJEV-E抗原を主要成分とすることがウエスタンブロット法で明らかになった。実験室的に調整したJ12#26抗原のLot-1とLot-2を、現行ワクチン抗原を標準に中和ELISA平行線検定を行ったところ、同一の中和抗原性を保持していることが示された。マウス免疫原性試験では、J12#26抗原接種で、現行ワクチン投与群と同等かそれ以上の高い中和抗体価(640倍以上)が、少なくとも7ヶ月まで観察された。J12#26抗原免疫マウスはJEV感染攻撃に対して、何ら臨床症状も示さず全匹生存した。

J12#26細胞株培養液のFBS濃度を10%から順次低下させ、無血清培地に馴化させた。馴化J12#26SF細胞は形態・増殖・長期継代安定性に変化が無く、抗原産生量も馴化前(現行ワクチンELISA当量で2.5 $\mu$ g/10<sup>4</sup>細胞)のレベルを維持していた。上記(1)項の新不活化ワクチン用培養Vero細胞由来JEV量(約10<sup>9</sup>PFU/ml)とELISA抗原価及びHA抗原価で比較しても2~3倍量の抗原を大量産生していた。しかも、培地交換を行うと同等量以上の抗原を再生産した。無血清培養液500mlから、上述の精製法よりも更に温和な方法(限外濾過濃縮・Sephacryl S-300分画・蔗糖密度勾配遠心・Sepadex G-25分画)により、蛋白

量で約1mg、ELISA抗原価で約10mg現行ワクチン当量の抗原が40%以上の高い収率で回収された。SDS-PAGE・蛋白蛍光染色及びウエスタンブロットで、抗原は高い精製度であることが確認された。低分子量領域に泳動された蛋白のN末端アミノ酸配列解析で、正常にプロセスされたM蛋白が生成されていることも確認された。精製抗原は小型球形粒子形態であることが電子顕微鏡観察で示された。無血清培地由来の精製抗原も現行ワクチンと同等かそれ以上の中和抗体価をマウスに誘導し、免疫マウスは50LD<sub>50</sub>のウイルス攻撃に対して100%の感染防御を示した。

### (3) HHV-6Bプロモーターの探索とDNAワクチンの開発

HCMVのIEプロモーターをコントロールにして、我々のクローニングしたHHV-6BのMIEプロモーターの活性をルシフェラーゼ発現系で比較検討した。その結果、293細胞やVero細胞など付着性の細胞では、HHV-6 MIEプロモーターはHCMV-IEプロモーターの1/100程度の活性しか示さなかった。しかし、SupT1やU937等のリンパ系細胞においては数倍高い発現効率が得られた。そこで、このプロモーター下流にJEV cDNAを連結したp9u/JEVenvによるJEVの外皮糖蛋白の発現を検索した。その結果、トランスフェクション48時間後の付着性細胞、浮遊リンパ系細胞何れにおいてもJEV蛋白の発現が検知されなかった。他方、HCMVのIEプロモーターを用いたpCDNA3.1/JEVenvではJEV蛋白の発現が確認された。また、陽性対照としたJEV感染Vero細胞では、外皮糖蛋白が容易に検出された。原因解明のため、GFP蛋白発現プラスミドを用いてトランスフェクション効率の確認を行った。その結果、SupT1細胞での導入効率は0.1%以下と低い値であったが、付着性の293細胞とVero細胞ではそれぞれ45%、20%と高い導入効率であった。

## 4. 考察

現行日本脳炎ワクチンは、マウス脳内に日本脳炎ウイルス(JEV)を接種して、神経症状を呈したマウスから脳を採取し、これを原材料にしてウイルスを精製・不活化したワクチンで、これが世界中で存在する唯一のワクチンである。WHOは脳のプリオン蛋白を原因とする狂牛病の勃発を重視し、さらには、ワクチン製造に大量(日本のみでも数百万匹)のマウスを犠牲にする動物愛護面、および、バイオハザード上封じ込めを必要とする感染性ウイルスを用いる点を指摘して、脳を材料としない・動物を犠牲にしない・製造上安全な、新しい日本脳炎ワクチンの開発を緊急課題として各国に提言していた。これを受けて、JEV感染培養Vero細胞の培養上清からJEVを回収・精製・不活化した組織培養不活化ワクチンが研究組織の阪大微研会で現在開発されつつある。

現行日本脳炎ワクチンは液状で、保存剤にチメロサルを含むが、新規ワクチンにはチメロサールの使用が認められなくなる。従って、新たな安定・保存剤の開発、安定な液状製剤の開発は、冷蔵庫・冷凍庫の設備が不十分な地域でのワクチン接種率の上昇に貢献し、財政負担を招く高コストを避けるうえで重要な問題である。そこで、製造試作ワクチン原液の安定性を調査した結果、保存剤等を含まずとも原液はJEV抗原含量及び抗原力価とも非常に安定であることが確認された。しかし、接種濃度に希釈し、保存剤に2-Phenoxyethanolを添加した試作ワクチンは、25℃以上の保存試験で顕著にJEV抗原含量及び力価とも低下した。このことは、不活化新ワクチン保存剤の更なる開発、安定な剤型開発の必要性を示唆している。一方、試作新ワクチンの有効性については、100倍以上希釈して接種してもウイルス感染攻撃に対する有効な防御免疫を、現行ワクチンと同等に賦与出来ることが示された。また、日本脳炎は中和抗体価が10倍以上あれば感染を防御できることが報告されているが、本研究においても、試作新ワクチン接種を受けた動物の免疫血清で受動免疫を受けたマウスには、10倍以上の中和抗体価が移入され、ワクチン製造株とは異なった強毒JEV株の感染に対しても防御できることが示された。従って、有効性は現行ワクチンと同等かより高いレベルにあり、新ワクチンの実現が更に近づいたものと思われる。

近年のゲノムテクノロジーの進展はウイルス蛋白遺伝子のみを発現ベクターに組み込み、感染性ウイルスを用いることなく、ウイルス蛋白を産生する技術的基盤を与えてきた。しかし、一般にウイルス抗原蛋白は細胞にtoxicなため、速やかに分解されるか、不溶化されるか、発現細胞自体にアポトーシスを誘導して死滅させるかであった。発現可能な場合でも、感染防御抗原エピトープが形成されない変性型であった。JEV抗原においても、E.coli.や酵母発現系は不可で、昆虫細胞/バキュロウイルス由来蛋白は防御抗原エピトープが消失していた。これまでの成功例は、我々と、米国のMasonらが、ワクシニアウイルスベクターを用いて発現させた2例しかない。本研究では、JEV感染・複製に関するこれまでの研究を基に、JEV抗原発現による細胞融合・細胞死を生じないようJEV感染

抵抗性の細胞を親株とし、且つ、発現JEV抗原が細胞内に滞留せず速やかに分泌されるようJEV自身のシグナル配列を付加して、JEV抗原持続産生細胞株J12#26の樹立に成功した。この細胞株培養上清から精製したJ12#26抗原の抗原性解析とマウスを用いた中和抗体誘導試験・感染防御試験を実施し、J12#26抗原が現行ワクチンと同等又はそれ以上のワクチン効果を示すことを明らかにした。次いで、牛血清蛋白混入の可能性を排除するため、産生量の低下なく無血清培地に馴化させる課題に取り組み、成功した。抗原産生量は上記新不活化ワクチンの10倍にも及び、高価なFBSも、バイオセーフティー設備も不要なため、極めて安価なワクチンが期待できよう。WHOの求める理想の新規ワクチン実現が一層高まったものと考えられる。また、フラビウイルスワクチンは現在日本脳炎ワクチンしか存在しないが、これらワクチン開発にも波及しうる有用性を含んでいる。このように想定以上の進展が得られたことから(特願2002-229597:日本脳炎抗原及びその製造方法)、当初の計画を変更して、研究の中心を他のフラビワクチン開発にする予定である。

DNAワクチン開発ではプロモーターの開発がキーポイントになる。HCMV-IEプロモーターは、その活性が強いためDNAワクチンに汎用されているが、特許の問題がありこれを実用化することは難しい。これまでの事例では、プロモーター・発現遺伝子/産生抗原の性状・発現細胞等の組み合わせにより、DNAワクチンの結果が大きく左右されている。これら個々の経験例の中から何らかの法則性はまだ見出されていない。培養系での発現効率と動物個体での免疫効率が必ずしも一致するわけでもない。特に、抗原提示細胞として大きな役割を果たしているリンパ系細胞での抗原発現効率については、ほとんどの点が不明である。この点において、モノサイト・マクロファージに親和性の高いHHV-6のプロモーター開発は極めて重要であろう。本研究において、クローニングされたHHV-6 MIEプロモーターがリンパ系細胞でHCMV-IEプロモーターの数倍の発現活性を示したことは興味深い。しかし、発現遺伝子をレポーター遺伝子からJEVの外皮糖蛋白遺伝子に変換したときに、その活性が検出されなかった点は不可解な結果であった。発現JEV蛋白がフィードバックして、逆にプロモーター活性が抑制されたのか、発現抗原がこれらの細胞では不安定なのか、現在原因の解明に努めている。

## 5. 研究発表

武藤栄次、田中恵子、石川豊数、高見沢昭久、佐多徹太郎、倉田毅、小島朝人：持続細胞株が大量に産生する日本脳炎ウイルスE蛋白中和抗原粒子の精製と抗原性・免疫原性の解析、第6回日本ワクチン学会学術集会、2002年。

村木優子：組織培養日本脳炎、第6回日本ワクチン学会、2002

大西敏之、村木優子、藤田 武、石川豊数、秋山正尊、石橋正英、東 雍：継代培養細胞による不活化日本脳炎ワクチンの開発-6。日本脳炎ウイルス生態学研究会、2002

村木優子、宮武 浩、高原日出夫、真鍋貞夫、石川豊数、石橋正英、東 雍：Vero細胞を用いた不活化日本脳炎ワクチンの開発。日本臨床ウイルス学会、2001

村木優子、宮武 浩、高原日出夫、大西敏之、石川豊数、石橋正英、東 雍：継代培養細胞による不活化日本脳炎ワクチンの開発-5。日本脳炎ウイルス生態学研究会、2001

Kondo K, Sashihara J, Shimada K, Takemoto M, Amo K, Miyagawa H, Yamanishi K. Recognition of a novel stage of betaherpesvirus latency in human herpesvirus 6. *J Virol* 77:2258-64, 2003.

Amo K, Tanaka-Taya K, Inagi R, Miyagawa H, Miyoshi H, Okusu I, Sashihara J, Hara J, Nakayama M, Yamanishi K, Okada S. Human herpesvirus 6B infection of the large intestine of patients with diarrhea. *Clin Infect Dis* 36:120-3, 2003.

Sashihara J, Tanaka-Taya K, Tanaka S, Amo K, Miyagawa H, Hosoi G, Taniguchi T, Fukui T, Kasuga N, Aono T, Sako M, Hara J, Yamanishi K, Okada S. High incidence of human herpesvirus 6 infection with a high viral load in cord blood stem cell transplant recipients. *Blood* 100: 2005-11, 2002.

Mori Y, Seya T, Huang HL, Akkapaiboon P, Dhepakson P, Yamanishi K. Human herpesvirus 6 variant A but not variant B induces fusion from without in a variety of human cells through a human herpesvirus 6 entry receptor, CD46. *J Virol* 76:6750-61, 2002.

Sugimoto T, Tanaka-Taya K, Ono J, Miyoshi H, Okada S, Yamanishi K. Human herpesvirus-6 infection in neonates: Not protected by only humoral immunity. *Pediatr Int* 44:281-5, 2002.

Tokimasa S, Hara J, Osugi Y, Ohta H, Matsuda Y, Fujisaki H, Sawada A, Kim JY, Sashihara J, Amou

- K, Miyagawa H, Tanaka-Taya K, Yamanishi K, Okada S. Ganciclovir is effective for prophylaxis and treatment of human herpesvirus-6 in allogeneic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 29:595-8, 2002.
- Kondo, K., K. Shimada, J. Sashihara, K. Tanaka-Taya, and K. Yamanishi. Identification of human herpesvirus 6 latency-associated transcripts. *J Virol* 76:4145-51, 2002.
- Kondo, K., T. Kondo, K. Shimada, K. Amo, H. Miyagawa, and K. Yamanishi. Strong interaction between human herpesvirus 6 and peripheral blood monocytes/macrophages during acute infection. *J Med Virol* 67:364-9, 2002.
- Dhepakson, P., Y. Mori, Y. B. Jiang, H. Huang, P. Akkapaiboon, T. Okuno, and K. Yamanishi. Human herpesvirus 6 rep/U94 gene product has a single-stranded DNA binding activity. *J Gen Virol* 83:847-54, 2002.
- Tanaka, H., T. Nishimura, M. Hakui, H. Sugimoto, K. Tanaka-Taya, and K. Yamanishi. Human herpesvirus 6-associated hemophagocytic syndrome in a healthy adult. *Emerg Infect Dis* 8:87-8, 2002.

## 6. 知的所有権の取得状況

### 1) 特許出願

出願番号：特願2002-229597

発明の名称：日本脳炎抗原及びその製造方法