

ながらPNB培地上での発育も見られNTMの混在が明らかな3症例に耐性遺伝子検査を実施した。培養陰性の一例はINH・SM耐性、もう一例はRFP・SM耐性と判定された。通常の薬剤感受性検査が出来ないため、結果の妥当性は判定不能である。しかし薬剤感受性に従った治療で両者とも順調に改善しており、臨床的には有用と判断している。一方NTM混在例は、SM耐性2例、EB耐性1例で、純培養後の通常の薬剤感受性とほとんど一致しており、臨床的にも有用であった。

D. 考察

多剤耐性結核の克服にとって、正しい薬剤感受性検査が迅速に得られることは必須の項目である。今回の5症例は従来の培養法を用いる薬剤感受性結果が得られないか、正確な結果を得るのに長期間要し、臨床的には問題の例であった。今回市販の2キットを用いて、薬剤耐性遺伝子の変異の有無の検討を実施した。その結果は臨床的な薬剤選択判断に有益な情報をもたらした。培養不能例では結果の妥当性の判断は正確にはできない。しかし臨床経過は順調であり、結果が正しかったものと推定している。一方NTM混在例の結果は、後に結核菌を純培養して得られた薬剤感受性結果との比較が可能であった。一部若干の相違はあったものの臨床的に問題になるほどではなく、特にINH・RFPの結果は完全に一致していた。通常の薬剤感受性検査が不能な例、また結果が変動したり臨床経過と合わない例では、耐性遺伝子を用いた薬剤感受性検査で臨床上有益な情報が得られる可能性が示唆された。

E. 結論

通常の薬剤感受性検査が実施できない場合、または結果を得るのに長期間要する

場合、薬剤耐性遺伝子を用いる感受性検査で臨床的に有益な情報が得られる可能性が示唆された。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. 富田元久、竹野華、鈴木克洋、坂谷光則、木下幸保、小林郁夫. バクテックMGIT960による薬剤感受性検査における接種菌量の検討と検査の再現性. 結核 79 (11) : 625-630, 2004

2. Shunji Takakura, Shigeo Tsuchiya, Yuichi Isawa, Kiyoshi Yasukawa, Toshinori Hayashi, Motohisa Tomita, Katsuhiko Suzuki, Tatsuro Hasegawa, Takanori Tagami, Atsuyuki Kurashima, and Satoshi Ichiyama: Rapid detection of Mycobacterium tuberculosis in respiratory samples by transcription - reverse transcription concerted reaction with an automated system. J. Clin. Microbiol 43:5435-5439, 2005

3. 鈴木克洋、吉田志緒美、露口一成、源誠二郎、井上義一、林清二、岡田全司、坂谷光則 肺カンサシ症の治療 結核 81 : 41-43, 2006

4. 鈴木克洋 : 「結核」第4版、結核の感染と発病・結核菌検査・臨床検査(pp117-118)・症例編: 薬剤アレルギーのため化学療法が施行できず無治療(富岡洋海編)印刷中、医学書院、東京、2006

5. 鈴木克洋 : 質疑応答、肺MAC症の診断・治療. 日本医事新報4225 : 90-91, 2005

6. 鈴木克洋：病気と薬の説明ガイド
2005 肺結核 薬局 56 (1) : 899
-905、2005
 7. 鈴木克洋：診療の秘訣「ツベルクリン
反応の解釈」Modern Physician 印刷
中
 8. 鈴木克洋：私の処方「肺MAC症」
Modern Physician 25:1596, 2005
 9. 鈴木克洋：肺結核を見落とさないため
に 呼吸と循環 54:63-69, 2006
 10. 鈴木克洋：肺非結核性抗酸菌症は増加
している：臨床からみた病原性と宿主
要因の考察 最新医学61：258-265、
2006
 11. 鈴木克洋：抗菌薬をつかいこなそう
「結核」メデイチャーナ 印刷中
2. 学会発表
1. 鈴木克洋. 肺カンサシの治療 <シン
ポジウム非結核性抗酸菌症の治療>
第80回日本結核病学会総会 (2005.5.
12埼玉)
- H. 知的財産権の出願状況・登録状況
なし

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）
分担研究報告書

自然免疫系による結核感染防御機構

研究協力者 竹田 潔 九州大学生体防御医学研究所教授

研究要旨

TLRを介した自然免疫系の活性化が消失するTRIF/MyD88二重欠損マウスを用いて、結核感染における自然免疫系の関与について検討した。正常マウス、MyD88欠損マウス、TRIF欠損マウスではBCG感染による肺病変は観察されないが、MyD88/TRIF二重欠損マウスの肺では、BCG菌数の増加を伴う多数の壊死性病変が観察され、約半数が死亡した。また結核菌MtbH37Ra株の経気道的感染でも、TRIF/MyD88二重欠損マウスは感受性が高かった。この結果は、TLRを介した自然免疫系の活性化が結核感染防御にも生体レベルで重要な役割を担っていることを示している。結核感染においては、Th1応答が感染防御に重要な役割を担っている。MyD88欠損マウスでは、BCG感染後のTh1応答が正常と比べて3分の1程度に低下するが、TRIF/MyD88二重欠損マウスでもTh1応答の障害は同程度しか認められなかった。この結果は、TLRを介した自然免疫シグナル以外にもTh1誘導機構が存在し、さらに自然免疫系がTh1誘導以外の分子機構により結核感染を制御していることを示唆している。

A. 研究目的

自然免疫系は、病原体の宿主内への侵入を最初に察知し、種々の炎症・免疫応答を誘導する重要な免疫系である。しかしながら、B、T細胞が主役を演じる獲得免疫系の分子機構が詳細に解析されてきているのに対し、自然免疫系の作動メカニズムはほとんど理解されていない。最近、Toll-like receptor (TLR)ファミリーが、病原体の構成成分の認識に関与していることが明らかになってきた。結核菌に対する生体防御においても、TLRファミリーによる結核菌の認識が重要な役割を果たす可能性が考えられる。本研究では、自然免疫系による結核などの病原体の生体内への侵入を察知するメカニズムをToll-like receptor (TLR)

を中心とした受容体の解析から明らかにし、結核感染における免疫系作動の分子機構を解明することを目的とする。

B. 研究方法

これまで、TLRを介した自然免疫系の活性化機構の解析から、TLRを介したシグナル伝達経路では、TIRドメインを有するアダプターMyD88とTRIFが重要な役割を担っていて、TRIF/MyD88二重欠損マウスでは、TLRシグナルが完全に消失することを明らかにしている。そこで、TLRを介した自然免疫系の活性化の結核感染防御における役割を、TRIF/MyD88二重欠損マウスを作製し解析した。正常マウス、TRIF欠損マウス、MyD88欠損マウス、およびTRIF/

MyD88二重欠損マウスにワクチン株であるBCGを感染させ、肺病変を解析し、また感染後の生存率を測定した。また結核菌MtbH37Ra株を経気道的に感染させ、肺内の菌数を測定し、また生存率を測定した。

(倫理面への配慮)

本研究は実験動物を用いたものであるが、実験動物の飼育は、空調設備、照明の時間制御の整ったSPF環境化で週に1回の床敷交換、餌水分補給を専門職員に委託し、行っている。また、毎年秋に動物慰霊祭を行っている。また実験に当たっては、麻酔操作を行い、極力苦痛の軽減を行うよう配慮している。

C. 研究結果

マウスにワクチン株であるBCGを感染させたところ、正常マウス、TRIF欠損マウス、MyD88欠損マウスでは肺組織に著明な変化は認められないが、TRIF/MyD88二重欠損マウスでは感染2週間以内に壊死を伴った病理変化が観察された。抗酸菌染色を行ったところTRIF/MyD88二重欠損マウスの肺では、多数の抗酸菌が観察された。生存率を測定しても、他のマウスと異なり、TRIF/MyD88二重欠損マウスは約半数が死亡した。また、結核菌MtbH37Ra株を感染させたところ、MyD88欠損マウスは正常マウスよりやや感受性が高いが、TRIF/MyD88二重欠損マウスはさらに感受性が高くなっており、肺内の結核菌数も多くなり、生存率も低下していた。これらのことから、TRIF/MyD88二重欠損マウスは結核感染に高感受性を示すことが明らかになった。この結果は、自然免疫系の活性化シグナルが、結核菌感染防御に重要な役割を担っていることを示している。BCG感染によるTh1応答を、CD4陽性T細胞からのIFN- γ 産生を指標に解析したところ、

MyD88欠損マウスでは正常に比べて1/3程度に低下していたが、TRIF/MyD88二重欠損マウスでもMyD88欠損マウスと同程度の低下しか認めず、有意にTh1応答が観察された。このことは、結核感染においてはTLR非依存性にTh1細胞の分化が誘導されることを示している。

D. 考察

TRIF/MyD88二重欠損マウスを用いた結核感染実験から、TLRを介した自然免疫系の活性化が、結核感染防御に重要であることが明らかになった。さらに結核感染に対するTh1応答には、TLR非依存的なメカニズムが存在することも明らかになった。今後、TRIF/MyD88二重欠損マウスが結核感染に高感受性になる分子機構、Th1分化の誘導機構を解析する。

E. 結論

自然免疫系のTLRを介した活性化が、結核感染防御に重要であることが明らかになった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Kuwata, K., Matsumoto, M., Atarashi, K., Morishita, H., Hirotsu, T., Koga, R., and Takeda, K.: I κ BNS inhibits induction of a subset of Toll-like receptor-dependent genes and limits inflammation. *Immunity* 24, 41-51 (2006).
2. Ogawa, A., Tagawa, T., Nishimura, H., Yajima, T., Abe,

- T., Arai, T., Taniguchi, M., Takeda, K., Akira, S., Nimura, Y., and Yoshikai, Y.: Toll-like receptors 2 and 4 are differentially involved in Fas-dependent apoptosis in Peyers patch and liver at an early stage after bile duct ligation in mice. *Gut* 5, 105-113 (2006).
3. Wieland, C. W., Florquin, S., Maris, N. A., Hoebe, K., Beutler, B., Takeda, K., Akira, S., and van der Poll, T.: The MyD88-dependent, but not the MyD88-independent, pathway of TLR4 signaling is important in clearing nontypeable haemophilus influenzae from the mouse lung. *J. Immunol.* 175, 6042-6049 (2005).
 4. Sato, S., Sanjo, H., Takeda, K., Ninomiya-Tsuji, J., Yamamoto, M., Kawai, T., Matsumoto, K., Takeuchi, O., and Akira, S.: Essential function for the kinase TAK1 in innate and adaptive immune responses. *Nat. Immunol.* 6, 1087-1095 (2005).
 5. Yukawa, K., Tanaka, T., Owada-Makabe, K., Tsubota, Y., Bai, T., Maeda, M., Takeda, K., Akira, S., and Iso, H.: Reduced prepulse inhibition of startle in STAT6-deficient mice. *Int. J. Mol. Med.* 16, 673-675 (2005).
 6. Matsukawa, A., Kudo, S., Maeda, T., Numata, K., Watanabe, H., Takeda, K., Akira, S., and Ito, T.: Stat3 in resident macrophages as a repressor protein of inflammatory response. *J. Immunol.* 175, 3354-3359 (2005).
 7. Kato, H., Sato, S., Yoneyama, M., Yamamoto, M., Uematsu, S., Matsui, K., Tsujimura, T., Takeda, K., Fujita, T., Takeuchi, O., and Akira, S.: Cell type-specific involvement of RIG-I in antiviral response. *Immunity* 23, 19-28 (2005).
 8. Ohkawara, T., Takeda, H., Nishihira, J., Miyashita, K., Nihiwaki, M., Ishiguro, Y., Takeda, K., Akira, S., Iwanaga, T., Sugiyama, T., and Asaka, M. Macrophage migration inhibitory factor contributes to the development of acute dextran sulphate sodium-induced colitis in Toll-like receptor 4 knockout mice. *Clin. Exp. Immunol.* 141, 412-421 (2005).
 9. Weiss, D. S., Takeda, K., Akira, S., Zychlinsky, A., and Moreno, E.: MyD88, but not Toll-like receptors 4 and 2, is required for efficient clearance of *Brucella abortus*. *Infect. Immun.* 73, 5137-5143 (2005).
 10. Yang, S., Takahashi, N., Yamashita, T., Sato, N., Takahashi, M., Mogi, M.,

- Uematsu, T., Kobayashi, Y., Nakamichi, Y., Takeda, K., Akira, S., Takada, H., Udagawa, N., and Furusawa, K.: Muramyl dipeptide enhances osteoclast formation induced by lipopolysaccharide, IL-1 β , and TNF- α through nucleotide-binding oligomerization domain 2-mediated signaling in osteoblasts. *J. Immunol.* 175, 1956-1964 (2005).
11. Shindou, H., Ishii, S., Yamamoto, M., Takeda, K., Akira, S., and Shimizu, T.: Priming effect of lipopolysaccharide on acetyl-coenzyme A: lyso-platelet-activating factor acetyltransferase is MyD88 and TRIF independent. *J. Immunol.* 175, 1177-1183 (2005).
12. Kitching, A. R., Turner, A. L., Wilson, G. R., Semple, T., Odobasic, D., Timoshanko, J. R., O'sullivan, K. M., Tipping, P. G., Takeda, K., Akira, S., and Holdsworth, S. R.: IL-12p40 and IL-18 in crescentic glomerulonephritis: IL-12p40 is the key Th1-defining cytokine chain, whereas IL-18 promotes local inflammation and leukocyte recruitment. *J. Am. Soc. Nephrol.* 16, 2023-2033 (2005).
13. Yang, R., Murillo, F. M., Delannoy, M. J., Blosser, R. L., Yutzy, W. H. 4th, Uematsu, S., Takeda, K., Akira, S., Viscidi, R. P., Roden, R. B.: B lymphocyte activation by human papillomavirus-like particles directly induces Ig class switch recombination via TLR4-MyD88. *J. Immunol.* 174, 7912-7919 (2005).
14. Yang, R., Wheeler, C. M., Chen, X., Uematsu, S., Takeda, K., Akira, S., Pastrana, D. V., Viscidi, R. P., and Roden, R. B.: Papillomavirus capsid mutation to escape dendritic cell-dependent innate immunity in cervical cancer. *J. Virol.* 79, 6741-6750 (2005).
15. Xu, A. W., Kaelin, C. B., Takeda, K., Akira, S., Schwartz, M. W., and Barsh, G. S.: PI3K integrates the action of insulin and leptin on hypothalamic neurons. *J. Clin. Invest.* 115, 951-958 (2005).
16. Yukawa, K., Iso, H., Tanaka, T., Tsubota, Y., Owada-Makabe K., Bai, T., Takeda, K., Akira, S., and Maeda, M.: Down-regulation of dopamine transporter and abnormal behavior in STAT6-deficient mice. *Int. J. Mol. Med.* 15, 819-825 (2005).
17. Kumanogoh, A., Shikina, T., Suzuki, K., Uematsu, S., Yukawa, K., Kashiwamura, S., Tsutsui, H., Yamamoto, M., Takamatsu, H., Ko-Mitamura, E. P., Takegahara, N., Marukawa, S., Ishida, I., Morishita, H., Prasad, D. V.,

- Tamura, M., Mizui, M., Toyofuku, T., Akira, S., Takeda, K., Okabe, M., and Kikutani, H.: Nonredundant roles of Sema4A in the immune system: Defective T cell priming and Th1/Th2 regulation in Sema4A-deficient mice. *Immunity* 22, 305-316 (2005).
18. Hirotsani, T., Lee, P. Y., Kuwata, H., Yamamoto, M., Matsumoto, M., Kawase, I., Akira, S., and Takeda, K.: The nuclear I κ B protein I κ BNS selectively inhibits ipopolysaccharide-induced IL-6 production in macrophages of the colonic lamina propria. *J. Immunol.* 174, 3650-3657 (2005).
19. Araki, A., Kanai, T., Ishikura, T., Makita, S., Uraushihara, K., Iiyama, R., Totsuka, T., Takeda, K., Akira, S., and Watanabe, M.: MyD88-deficient mice develop severe intestinal inflammation in dextran sodium sulfate colitis. *J. Gastroenterol.* 40, 16-23 (2005).
20. Kamezaki, K., Shimoda, K., Numata, A., Haro, T., Kakumitsu, H., Yoshie, M., Yamamoto, M., Takeda, K., Matsuda, T., Akira, S., Ogawa, K., and Harada, M.: Roles of Stat3 and ERK in G-CSF Signaling. *Stem Cells* 23, 252-263 (2005).
21. Yukawa, K., Kishino, M., Goda, M., Liang, X. M., Kimura, A., Tanaka, T., Bai, T., Owada-Makabe, K., Tsubota, Y., Ueyama, T., Ichinose, M., Maeda, M., Takeda, K., and Akira, S.: STAT6 deficiency inhibits tubulointerstitial fibrosis in obstructive nephropathy. *Int. J. Mol. Med.* 15, 225-230 (2005).
22. Akamine, M., Higa, F., Arakaki, N., Kawakami, K., Takeda, K., Akira, S., and Saito, A.: Differential roles of Toll-like receptors 2 and 4 in in vitro responses of macrophages to *Legionella pneumophila*. *Infect. Immun.* 73, 352-361 (2005).
23. Yukawa, K., Kishino, M., Hoshino, K., Shirasawa, N., Kimura, A., Tsubota, Y., Owada-Makabe, K., Bai, T., Tanaka, T., Ueyama, T., Ichinose, M., Takeda, K., Akira, S., and Maeda, M.: The kinase domain of death-associated protein kinase is inhibitory for tubulointerstitial fibrosis in chronic obstructive nephropathy. *Int. J. Mol. Med.* 15, 73-78 (2005).
24. Vossenkämper, A., Went, T., Alvarado-Esquivel C., Takeda, K., Akira, S., Pfeffer, K., Alber, G., Lochner, M., Förster, I. and Liesenfeld, O: Both IL-12 and IL-18 contribute to small intestinal Th1-type immunopathology following oral infection with *Toxoplasma gondii* but IL-12 is dominant over IL-18 in parasite control. *Eur. J. Immunol.* 34,

- 3197-3207 (2004).
25. Yokozeki, H., Wu, M. H., Sumi, K., Awad, S., Satoh, T., Katayama, I., Takeda, K., Akira, S., Kaneda, Y., and Nishioka, K.: In vivo transfection of a cis element 'decoy' against signal transducers and activators of transcription 6 (STAT6)-binding site ameliorates IgE-mediated late-phase reaction in an atopic dermatitis mouse model. *Gene Ther.* 11, 1753-1762 (2004).
 26. Sumi, K., Yokozeki, H., Wu, M. H., Satoh, T., Kaneda, Y., Takeda, K., Akira, S., and Nishioka, K.: In vivo transfection of a cis element 'decoy' against signal transducers and activators of the transcription 6 (STAT6) binding site ameliorates the response of contact hypersensitivity. *Gene Ther.* 11, 1763-1771 (2004).
 27. Takeda, K.: Toll-like receptors and their adaptors in innate immunity. *Cur. Med. Chem. AIAA.* 4, 3-11 (2005).
 28. Takeda, K., and Akira, S.: Toll-like receptors in innate immunity. *Int. Immunol.* 17, 1-14 (2005).
 29. Takeda, K.: Evolution and integration of innate immune recognition systems: the Toll-like receptors. *J. Endotoxin Res.* 11, 51-55 (2005).
 30. Takeda, K., Hemmi, H., and Akira, S.: Mechanism for recognition of CpG DNA. *Vaccine Adjuvants* 71-87 (2005).
2. 学会発表
 1. Kiyoshi Takeda, The roles of STATs in inflammatory responses: Lessons from the knockout mouse. (symposium, invited), American Thoracic Society 2005, 2005.5-20-25, San Diego, USA
 2. Kiyoshi Takeda, Makoto Matsumoto, Toll-like receptor-dependent innate immune responses in mycobacterial infection. US-Japan cooperative medical science program. 40th Tuberculosis and Leprosy Research Conference, 2005.7.28-30, Seattle, USA
 3. Kiyoshi Takeda, Regulation of Toll-like receptor-mediated gene expression by nuclear IκB proteins. The 6th EMBL Mouse Molecular Genetics Meeting, 2005.9.28-10.2, Heidelberg, Germany
 4. 竹田潔, Toll-like receptors and pathogen recognition (Symposium, invited) 第78回日本細菌学会総会, 2005.4.4-6, 東京
 5. 竹田潔, Toll-like receptorと結核感染 (シンポジウム) 第80回日本結核病学会, 2005.5.12-13, 埼玉

6. 竹田潔、自然免疫シグナルの制御機構（ワークショップ、招待講演）
第5回日本蛋白質科学会年会、2005.7.1、福岡
7. 竹田潔、Toll-like receptorを介した自然免疫系の制御（特別講演）
第45回日本リンパ網内系学会総会、2005.7.14-15、福岡
8. 竹田潔、自然免疫系と炎症性腸疾患（シンポジウム、招待講演）第42回日本消化器免疫学会総会、2005.8.4-5、東京
9. Kiyoshi Takeda: Regulation of innate immune responses against intracellular pathogen infection (Symposium)第35回日本免疫学会学術集会、2005.12.13-15、横浜
10. 桑田啓貴、竹田潔、Regulation of Toll-like receptor dependent gene induction by nuclear IκB protein IκBNS. 第35回日本免疫学会学術集会、2005.12.13-15、横浜
11. 古賀律子、濱野真二郎、松本真琴、枝一、審良静男、姫野國介、竹田潔、Involvement of Toll-like receptor-dependent activation of innate immunity in Trypanosomacruzi infection. 第35回日本免疫学会学術集会、2005.12.13-15、横浜
12. 松本真琴、桑田啓貴、山本雅裕、審良静男、吉開泰信、竹田潔、The role of Toll-like receptor signaling in mycobacterial infection. 第35回日
- 本免疫学会学術集会、2005.12.13-15、横浜
- H. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許取得
なし
 2. 実用新案登録
なし
 3. その他
なし

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）
分担研究報告書

新規結核DNAワクチンおよびバキュロウイルスビリオンワクチンの
開発に関する研究

研究協力者 吉田 栄人 自治医科大学 講師

研究要旨

平成15年度より開始しているカニクイザル実験は順調に成果を上げており、世界に先駆けた結核DNAワクチンの臨床応用に着実に前進している。さらにジェノメディア株式会社との共同開発によりGMPレベルで製造したHsp65+IL-12/DNAワクチンがマウスモデルでBCGをはるかに凌ぐ効果を得た。現在、カニクイザル実験を実施中である。

結核DNAワクチンの成果と合わせて、新しいタイプの結核ワクチンとしてバキュロウイルスベクターの可能性を見出したことは、研究の独創性を有し、今後の展開に大きな期待が寄せられる。

A. 研究目的

結核感染率を激減させ、また多剤耐性結核等の難治性結核を治療しうる画期的な次世代ワクチンを開発することを最終ゴールとする。特に新規結核DNAワクチンの開発を目指す。合わせて、バキュロウイルス粒子を用いた新しいアイデアのワクチン開発にも取り組む。

B. 研究計画

IL-12遺伝子を”DNAアジュバンド”としたHsp65結核DNAワクチンをHVJリポソームに包埋し(Hsp65+IL-12/DNA)、これを実験モデル動物(マウス、モルモット、カニクイザル)に接種する。結核菌のエアゾル感染を行い、ワクチン効果を解析する。これらの動物実験結果をもとに、プロトタイプの改良および臨床試験申請のためのデータをまとめる。一方、GMPレベルでの生産方法が確立しているHVJ(Hsp65+IL-12

/DNA)と従来のHVJリポソーム(Hsp65+IL-12/HVJ)とのワクチン効果の比較・検討を行い、臨床試験のための基礎データを得る。さらに、BCGワクチンとの併用によるHsp65+IL-12/DNAの相乗効果を検討する。結核菌由来の抗原あるいは遺伝子を導入した組換えバキュロウイルスビリオンを作製し、マウスで感染防御効果を検討する。さらに結核菌感染後のワクチン接種を想定し、Hsp65+IL-12/DNAの結核予防ワクチンとしての効果を検討する。

C. 研究成果・考察

現在までにマウス、モルモット、ヒトよりIL-12遺伝子をクローニングし、DNAワクチン用高発現ベクターを独自に開発した。これにより、実験動物として、マウス、モルモット、カニクイザルを用いてHVJリポソームDNAワクチンを評価することが可能となった。現在、DNAワクチンを接種した

カニクイザルでは、致死量の結核菌を接種されてもレントゲン検査で結核病巣の陰影を見ることもなく、長期生存を続けている。

GMPレベルで生産したHVJは、本年度より本格的にマウスモデルの実験を開始した。BCGで初回ワクチンをした後、Hsp65+IL-12/Envで追加ワクチンを行うと、BCG単独と比較して1万倍もの強力なワクチン効果を示すことが明らかとなった。並行して、治療用ワクチンとしての効果も検討中である。

バキュロウイルスはヒトに感染しない安全性の高いウイルスベクターである。昨年度作製した(i) Hsp65タンパクをウイルスピリオン上に提示した組換えバキュロウイルス(ii) Hsp65遺伝子をCMVプロモーター下流に挿入した組換えバキュロウイルスの二種類の組換えバキュロウイルスはマウスマクロファージRAW264.7細胞に作用し、NOの発現を強力に誘導することを見出した。結核菌は、マクロファージの細胞内殺菌をエスケープして増殖する。活性化マクロファージでは結核菌に対する殺菌活性が亢進するが、その重要な役割を果たしているのがNOであると考えられている。バキュロウイルスワクチンによりこの抗菌エフェクター分子であるNOが誘導されたことは、ワクチン開発に大きな期待がもたれる。今後、上記の確立した動物実験系を用いて解析を行っていく予定である。

D. 結論

平成15年度より開始しているカニクイザル実験は順調に成果を上げており、世界に先駆けた結核DNAワクチンの臨床応用に着実に前進している。さらにジェノミディア株式会社との共同開発によりGMPレベルで製造したHsp65+IL-12/DNAワクチンがマウスモデルでBCGをはるかに凌ぐ効果を得た。現在、カニクイザル実験を

実施中である。

結核DNAワクチンの成果と合わせて、新しいタイプの結核ワクチンとしてバキュロウイルスベクターの可能性を見出したことは、研究の独創性を有し、今後の展開に大きな期待が寄せられる。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Yoshida S & Watanabe H.: Robust salivary gland-specific transgene expression in *Anopheles stephensi* mosquito. *Insect Mol Biol* 2006, in press.
2. Yoshida S, Tanaka T, Kita Y, Kuwayama S, Kanamaru N, Muraki Y, Hashimoto S, Inoue Y, Sakatani Y, Kobayashi E, Kaneda Y, Okada M.: DNA vaccine using hemagglutinating virus of Japan-liposome encapsulating combination encoding mycobacterial heat shock protein 65 and interleukin-12 confers protection against *Mycobacterium tuberculosis* by T cell activation. *Vaccine* 24:1191-204, 2006.
3. Kita Y, Tanaka T, Yoshida S, Ohara N, Kaneda Y, Kuwayama S, Muraki Y, Kanamaru N, Hashimoto S, Takai H, Okada C, Fukunaga Y, Sakaguchi Y, Furukawa I, Yamada K, Inoue Y, Takemoto Y, Naito M, Yamada T, Matsumoto M, McMurray DN, Cruz ECD, Tan EV, Abalos RM, Young LJ, Burgos JA, Gelber R, Skeiky Y,

- Reed S, Sakatani M, Okada M.: Novel recombinant BCG and DNA-vaccination against tuberculosis in cynomolgus monkey model. *Vaccine* 23:2132-5, 2005.
4. Okada M, Takemoto Y, Okuno Y, Hashimoto S, Yoshida S, Fukunaga Y, Tanaka T, Kita Y, Kuwayama S, Muraki Y, Kanamaru N, Takai H, Okada C, Sakaguchi Y, Furukawa I, Yamada K, Matsumoto M, Kase T, deMello DE, Peiris JSM, Chen P-J, Yamamoto N, Yoshinaga Y, Nomura T, Ishida I, Morikawa S, Tashiro M, Sakatani M.: The development of vaccines against SARS corona virus in mice and SCID-PBL/hu mice. *Vaccine* 23:2269-72, 2005.
- 2.学会発表
1. Yoshida S & Watanabe H.: Establishment of robust salivary gland-specific transgene expression system in Anopheline mosquito. 54th Annual Meeting of American Society of Tropical Medicine and Hygiene (2005) USA.
2. Yoshida S & Watanabe H.: Robust salivary gland-specific expression in transgenic Anopheline mosquito. EMBO WORKSHOP 2005 "Molecular and Population Biology of Mosquitoes and Other Disease sVectors" (2005) Greece.
3. Okada M, Takemoto Y, Okuno Y, Hashimoto S, Fukunaga Y, Tanaka T, Kita Y, Kuwayama S, Muraki Y, Kanamaru N, Takai H, Okada C, Sakaguchi Y, Furukawa I, Yamada K, Izumiya M, Yoshida S, Matsumoto M, Kase T, Peiris J, Morikawa S, Tashiro M, Sakatani M : The development of DNA vaccines and antibody vaccine against SARS corona virus in mice and SCID-PBL/hu mice. The American Association of Immunologists Annual Meeting, "Immunology 2005" (2005) USA.
4. 吉田栄人：トランスジェニック蚊を用いたハマダラカマラリア原虫の寄生適応性の解明。基盤研究（C）（企画研究調査）「感染現象のマトリックス的解明をめざす企画調査研究」シンポジウム 感染現象のマトリックス (2006) 東京。
5. 吉田栄人：トランスジェニックカを用いたハマダラカマラリア原虫の生物学的適応性の解明。第4回分子寄生虫・マラリア研究フォーラム シンポジウム (2005) 東京。
6. 渡辺裕之、吉田栄人：ハマダラカ唾液腺に特異的な外来遺伝子の大量発現。第46回日本熱帯医学会大会 (2005) 京都。
7. 嶋田陽平、近藤大介、上妻由章、吉田栄人：海洋生物由来のレクチンを発現するトランスジェニックカのマラリア伝播阻止。第46回日本熱帯医学会大会 (2005) 京都。
8. 吉田栄人：トランスジェニックカによる蚊唾液腺-病原体の相互作用解明。第

57回衛生動物学会生理分子生物学談話
会 (2005) 札幌.

9. 吉田栄人、渡辺裕之、松岡裕之、羅恩
傑 : ハマダラカ唾液に存在するカルシ
ウム結合タンパクの分子生物学的解析。
第57回衛生動物学会 (2005) 札幌.
10. 渡辺裕之、吉田栄人 : 唾液腺特異的に
外来遺伝子を発現するトランスジェニ
ックハマダラカの作製。第57回衛生動
物学会 (2005) 札幌
11. 吉田栄人、渡辺裕之、松岡裕之、羅恩
傑 : 唾液腺特異的に外来異種タンパク
を発現するトランスジェニックハマダ
ラカの作製。第74回日本寄生虫学会
(2005) 米子.

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を
含む)

1. 特許取得

- ①特願 2005-280379 「DNA ワクチン組成
物」(2005年) 岡田全司、吉田栄人、中
島俊洋
- ②特願 2005-320817 「血小板凝集阻害組
成物」(2005年) 吉田栄人、周藤俊樹

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）
分担研究報告書

新しいワクチン開発のための前臨床試験について

研究協力者 松本 真 大塚製薬株式会社微生物研究所 所長

研究要旨

岡田班において見出されてきた有望なワクチン候補について、将来の臨床試験を開始するための前臨床試験としてどのような試験が必要かの調査を行った結果、安全性評価として①単回投与による毒性試験、②反復投与による毒性試験、③局所刺激性試験、④安全性薬理試験（hERG 試験、ラット一般行動への影響、無麻酔下のイヌを用いた呼吸・循環器系への影響）が、Phase I までに必要かと考えられた。また、まずそれに先立ち、最終被験物の企画の設定、企画の取れたものでの、信頼性保証に則った薬効薬理試験の実施が必要であると結論された。

A. 研究目的

岡田班において見出されてきた有望なワクチン候補について、将来の臨床試験を開始するための前臨床試験としてどのような試験が必要かの調査を行い、臨床第1相試験開始に必要な薬効薬理試験について計画することを目的とした。

B. 研究方法

岡田班により見出されたワクチン候補物質である HSP65+IL-12/HVJ-envelope、HSP65+IL-12/HVJ-envelope+BCG についての有用性については過去何年間に渡り、検討が行われ、良好な結果が得られている。また、サルを用いた評価試験も現在進行中であり、その結果が待たれるところである。そこで、本ワクチン候補のヒトでの安全性評価を実施するためには、どのような試験が前臨床で必要であるかについて調査を行い、その準備を行うことを計画した。方法としては、近

況のワクチン開発された事例の調査、公的機関が作成しているガイドラインの調査を行うことを計画した。また、臨床試験に向け、企画についても勘案した。

C. 研究結果

通常健常成人での第一相臨床試験（Phase1へと移行する場合、安全性を担保するだけの十分な根拠（毒性、ADMEなどの非臨床試験成績）及び有効性を示唆する根拠（薬理試験などの非臨床試験成績、さらに医薬品（この場合、DNAワクチンあるいはベクター）の品質・規格に関するデータを準備する必要がある。医薬品製造販売承認申請に用いることを前提に、毒性試験に関してはGLP基準、臨床試験ではGCP基準、品質・規格では関連する標準規格基準（合成品の場合、日局など）を遵守して実施されなければならない。

臨床第1相試験へ移行するために最も重要な前臨床試験である安全性評価試験に

ついて、関連すると思われるガイドラインとして、バイオ医薬品の非臨床安全性評価の実施に関する注意事項（ICHガイドラインS6）が、医薬審第326号、平成12年2月22日付で通知されているが、記載事項をみると『本ガイドラインはウイルスワクチン、DNAワクチンに適用されない』という記載がある。したがって、日本にはワクチンの毒性評価するためのガイドラインがなく、現在検討段階であることが判明した。但し、欧州においては

『Preclinical Pharmacological and Toxicological Testing of Vaccines』と題したガイドラインが、また『WHO Guidelines on Nonclinical Evaluation of Vaccines』題したガイドラインがWHOより発表されている。

現行ワクチンは、2つのプラスミドが別々のベクターに封入されており、現状のままでは、配合比率の問題など様々な問題が派生してくることが予想された。

D. 考察

新規医薬品に分類される従来型のワクチンで、臨床で複数回の投与が予定されるワクチンについては以下の試験が安全性評価としてPhase Iまでに必要かと考えられた。

- ・単回投与による毒性試験
- ・反復投与による毒性試験
- ・局所刺激性試験
- ・安全性薬理試験（hERG試験、ラット一般行動への影響、無麻酔下のイヌを用いた呼吸・循環器系への影響）

今回、岡田班で計画されているワクチン候補は、DNAワクチンであるため、従来型のワクチンとは異なり、恐らく追加項目として遺伝毒性試験が必要であると考えられる。また過去事例がないということでどのような試験が更に要求されるか、またはさ

れないかについては更なる調査および検討が必要と考えられた。

今後、臨床へ向けての第一の作業として、申請を念頭においた信頼性保証に則った試験の実施が必要であると考えられた。

E. 結論

現行の2つのプラスミドを1つできる可能性があるかどうかの検討と、最終被験物の企画の設定、企画の取れたものでの、信頼性保証に則った薬効薬理試験の実施が必要であると結論した。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究報告

1. 論文発表

1. Matsumoto S, Matsumoto M, Umemori K, Ozeki Y, Furugen M, Tatsuo T, Hirayama Y, Yamamoto S, Yamada T, Kobayashi K. DNA augments antigenicity of mycobacterial DNA-binding protein 1 and confers protection against Mycobacterium tuberculosis infection in mice. *J Immunol.* 175(1):441-449 (2005)

2. Makoto Matsumoto, Hiroyuki Hashizume, Hidetsugu Tsubouchi, Hirofumi Sasaki, Motohiro Itotani, Hideaki Kuroda, Tatsuo Tomishige, Masanori Kawasaki, and Makoto Komatsu Screening for Novel Antituberculosis Agent that are Effective Against Mutidrug Resistant Tuberculosis,

Current Topics in Medicinal
Chemistry, 6 (2006) in press

2. 学会発表

1. M.MATSUMOTO:ACS 229th Spring National Meeting Screening Novel Antituberculosis Agents Effective Against MDR-TB. San Diego, USA. 3.16 2005.
2. M.MATSUMOTO:36th Union World Conference on Lung Health OPC 67683:A novel anti-TB drug candidate with potential to shorten treatment duration. Paris-France. 10.18-22 2005.
3. M.MATSUMOTO: Tenth International Conference on Emerging Infectious Diseases in the Pacific Rim New anti-TB drug development in JAPAN. Hanoi. 11.15-16 2005.
4. M.MATSUMOTO,H.HASHIZUME, T.TOMISHIGE,M.KAWASAKI, M.KOMATSU,H.TSUBOUCHI, H. SASAKI and T. SUMITA:OPC-67683: A Novel Class Anti-Tuberculosis Drug Candidate. Washington, DC 45th ICAAC. 12.16-19 2005.
5. Sohkiichi Matsumoto, Makoto Matsumoto, Kiyoko Umemori, Yuriko Ozeki, Makoto Furugen, Tomishige Tatsuo, Yukio Hirayama, Saburo Yamamoto, Takeshi Yamada, and Kazuo Kobayashi: US-JAPAN COOPERATIVE MEDICAL SCIENCE PROGRAM THIRTY EIGHT TUBERCULOSIS AND LEPROSY RESEARCH CONFERENCE DNA AUGMENTS ANTIGENICITY OF MYCOBACTERIAL DNA-BINDING PROTEIN 1 AND CONFERS PROTECTION AGAINST MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS INFECTION IN MICE 7.19-21 2005.
6. M. OKADA, T. TANAKA, Y. KITA, N. KANAMARU, S. HASHIMOTO, H. TAKAI, Y. FUKUNAGA, Y. SAKAGUCHI, I. FURUKAWA, K. YAMADA, Y. MURAKI, S. KUWAYAMA, M. IZUMIYA, M. MATSUMOTO, M. SAKATANI:In Vivo Efficacy of Novel Antituberculous Candidate OPC-67683 against Multi-Drug Resistant M. tuberculosis (MDR-TB) using SCID Mice and SCID-PBL/hu Mice. Washington, DC 45th ICAAC. 12.16-19 2005.
7. M.KAWASAKI, K.YAMAMOTO, M.MATSUMOTO. : Mechanism of Action of OPC-67683 against Mycobacterium tuberculosis. Otsuka Pharmaceutical Co., Ltd. Tokushima, Japan. Washington, D C45th ICAAC. 12.16-19 2005.
8. H. HASHIZUME, T. TOMISHIGE, and M. KAWASAKI.:In Vitro and

- In Vivo Efficacy of Novel Antituberculous Candidate OPC-67683. Otsuka Pharmaceutical Co., Ltd., Tokushima, Japan Washington, DC 45th ICAAC. 12. 16-19 2005.
9. H. HASHIZUME, K. OHGURO, T. ITOH, T SHIRAGIKU, Y. OHARA, T. AWOGI, M. MATSUMOTO.: A Novel Imidazo-oxazole Antituberculous Compound, Free from Mutagenicity : Structure-Activity-Mutagenicity Relationships.. Otsuka Pharmaceutical Co., Ltd., Tokushima, Japan Washington, DC 45th ICAAC 12.16-19 2005.
- 10 T. TOMISHIGE, M. MATSUMOTO.: Intracellular Activity of OPC-67683 against M.tuberculosis H₃₇Rv in THP-1 Human Macrophages and A549 Type II Alveolar Cells. Otsuka Pharmaceutical Co., Ltd., Tokushima, Japan Washington, DC45th ICAAC
11. 平山 幸雄、松本 壮吉、青木 圭子、和田 崇之、尾関 百合子、松本 真、小林 和夫：抗酸菌の肺胞上皮細胞接着における分子機構；日本細菌学会，2004
12. 平井真吾、本圭介、巖岩靖子、菊地晴久、播口徳充、松本 真、大島吉輝：抗マラリアアルカロイド febrifugine を基盤とした新規誘導体の開発，日本薬学会3月29日～31日、2004
13. 菊地晴久、平井真吾、山本圭介、巖岩靖子、播口徳充、松本 真、大島吉輝：新規抗マラリア剤の創製を目指したキナゾリンアルカロイド febrifugine 関連化合物の合成、第23回メデイシナルケミストリーシンポジウム（つくば市）、2004年11月24～26日
14. Makoto Matsumoto, Hiroyuki Hashizume, Tatsuo Tomishige, Masanori Kawasaki, Hidetsugu Tsubouchi, Hirofumi Sasaki, Yoshihiko Shimokawa, and Makoto Komatsu :OPC-67683, A Promising Drug Candidate to Combat Unmet Needs in TB Chemotherapy (Submit)

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）
分担研究報告書

結核に対する新規DNAワクチンの製造・製剤化技術の開発に関する研究

研究協力者 中島俊洋 ジェノメディア株式会社 取締役・CTO

研究要旨

本年の研究では、HVJ-Eベクターをアジュバント兼デリバリーシステムとして利用するDNAワクチン開発に関して、臨床応用に必要な有効性と製造関連のデータ取得を目的として研究を行った。

有効性評価に関しては、3種類の結核の疾患モデル系（マウス、モルモット、サル）での評価に必要なプラスミドDNAを、臨床応用に適したプラスミドを使用して構築し、HVJ-Eベクターへの封入を行なった後に評価用サンプルとした。一方製造技術に関しては、プラスミドDNAの品質管理検査を行なうために必要な評価系と、HVJ-Eベクターへの封入・製剤化技術の確立を行った。

A. 研究目的

感染症の制御を有効に行なうためには、感染症の発生ステージに応じて適切なワクチン・治療薬の投与を行う必要がある。現在のところ、不活性化ワクチン、組換え蛋白ワクチンが実用化されているが、それらに次ぐ第3のワクチン技術として病原微生物の構成遺伝子や免疫活性化因子の遺伝子をワクチンとするDNAワクチンが注目されている。

DNAワクチンの実用化を成功させるためには、薬効成分で遺伝子発現用に用いるプラスミドDNAのデリバリーシステムと、発現した遺伝子による免疫活性化を促進するためのアジュバントが必要である。そこで、国産の遺伝子導入技術として開発が進められてきたHVJ-Eベクターをアジュバント兼デリバリーシステムとして利用し、有効性の高い新規結核DNAワクチンを開発する事を目的として研究を行なった。

B. 研究方法（倫理面への配慮）

(1) DNAワクチンの有効性評価用プラスミドの調製

従来研究用として使用していたpcDNA3.1プラスミドから、DNAワクチン用に開発されたプラスミドベクターであるpVAX1へ目的遺伝子（IL-12、HSP65）の組換えを行った。そのために、ヒトIL-12とHSP65についてはNheI/NotI断片を、モルモットIL-12についてはPmeI断片を、マウスIL-12についてはNheI/ApaI断片をそれぞれ調製して、pVAX1のNheI/NotI部位、PmeI部位、またはNheI/ApaIにそれぞれ組み込みを行った。

評価のために疾患モデルとして使用する小動物（マウス、モルモット）と、中動物（サル）の3種類それぞれのアッセイ系に

必要なプラスミドDNAを上記のように構築した後、試験に使用できる品質レベルのDNAを大量に製造した。製造したプラスミドDNAは、品質検査試験後にデリバリーシステム兼アジュバントであるHVJ-Eに封入し、品質レベルを確認した後に結核ワクチンとしての有効性検討に使用した。

(2) DNAワクチン開発のためのアッセイ構築

DNAワクチンの開発に必要なアッセイ系として、培養細胞で免疫の活性化を測定するアッセイ系と、プラスミドDNAにより発現される蛋白質定量アッセイ系をそれぞれ構築した。HVJ-Eのアジュバント効果である免疫活性化については、NF κ Bの活性化を測定する系の構築を行った。培養細胞にNF κ Bの結合部位をプロモーター領域に持つレポーター遺伝子(SEAP)を導入した後にクローニングを行い、反応性の高いクローンを選択してアッセイ用細胞として使用した。また、プラスミドDNAにより発現される蛋白質定量アッセイ系として、IL-12蛋白質については

ELISA法によるアッセイ系を、HSP65蛋白質に対してはウェスタンブロット法によるアッセイ系を構築した。アッセイにはBHK細胞を用い、対象となるプラスミドDNAを導入した後に、培養上清(IL-12蛋白質)または細胞溶解物(HSP65蛋白質)を回収して、目的の遺伝子の発現を確認するための測定に使用した。

(3) DNAワクチンの製造技術(封入、製剤)

HVJ-Eベクターに封入したDNAワクチン製剤の臨床応用のために、プラスミドDNAとHVJ-E製剤に関して製造技術を開発した。プラスミドDNAに関しては、遺伝子治療用医薬品のガイドラインに従って品質管理項目を設定して、ワクチンとしての有効性評価に使用するDNAにつ

いては、実際に品質管理基準に合致したプラスミドの製造を行った。一方、HVJ-Eベクターへの封入法についても封入工程の見直しを行い、実製造に適した簡便な封入法を開発した。

倫理面への配慮

本研究を実施するにあたり、ジェノミディア株式会社は、研究所の所在地である独立行政法人 産業総合技術研究所の規定に従い、国で定められている、組換えDNA実験、動物取り扱いに関する指針に従い、産業総合技術研究所で開催される各委員会での実験許可を受けてから実験を行っております。また、実験に従事するものの安全確保についても、産業総合技術研究所の規定に従い、年に1回行われる実験の安全講習に参加し、健康診断も受けて実験従事者の健康管理も確保しております。以上のように、本研究は倫理面の配慮をしたうえで実施されております。

C. 研究結果・考察

(1) DNAワクチンの有効性評価

従来の研究では、基礎研究用として広範に使用されているpcDNA3.1ベクターを用いて目的の遺伝子(IL-12およびHSP65)の発現を行ない、結核ワクチンとして優れた有効性を示すデータを取得した。pcDNA3.1は遺伝子の発現効率の高いベクターであるが、それをベースとするプラスミドDNAの製造にはアンピシリンを使用するため、残留する抗生物質によりアレルギーを誘発する可能性がある。そのため、臨床応用を考慮する場合にはアンピシリン耐性遺伝子以外のマーカー遺伝子を持つプラスミドベクターを使用する事が望ましい。

そこで、臨床応用を行なうためのプラスミドベクターとしてカナマイシン耐性遺伝

子をマーカー遺伝子として持つ発現ベクター（pVAX1）を選択し、DNAワクチン開発用のベクターの構築を行った。

pVAX1はDNAワクチン用に開発されたベクターで、発現ユニットはpcDNA3.1ベクターと共通であるため、同様に広範な組織で高発現を期待する事ができる。そこで、目的の遺伝子（ヒト、マウス、モルモットのIL-12遺伝子、HSP65遺伝子）を新規プラスミドベクターへ組換えを行って、目的の発現プラスミドを得た。制限酵素マップや配列確認により構築の確認を行なった後に、有効性試験に使用するプラスミドDNAの大量調製を行った。大量調製したプラスミドDNAは、デリバリーシステム兼アジュバントであるHVJ-Eへ封入を行なった後に、検査を行なって品質レベルを確認し、結核ワクチン評価のため疾患モデルとして使用する小動物（マウス、モルモット）と中動物（サル）のそれぞれの目的に応じて容量や濃度を調整した後に各アッセイ用に供与した。

(2) DNAワクチンの用量・用法を設定するための研究

有効性評価や臨床応用のために使用するDNAワクチンは、バイオ医薬の範疇に分類されると考えられる。そのため、制限酵のレベルを臨床応用レベル（治験薬GMPレベル）としていく予定である。

DNAワクチンの製造技術の検討

本研究で開発するDNAワクチン製剤を使用して臨床応用を開始するためには、治験薬としての品質レベルをもつ製剤を開発する必要がある。開発を行っている

DNAワクチンは薬効成分であるプラスミドDNAと、アジュバント兼デリバリーシステムであるHVJ-Eから構成されており、それぞれについて品質を管理し、最終製剤化を行なう必要がある。そこで、本年

素マップや配列確認等の検査に加えて、特性（力価）に関する検査を行なう必要がある。また、力価測定の結果と有効性評価のデータをもとにして用法用量設定を進める必要がある。そこで、力価検定のためのアッセイ系を構築し、実際に使用するプラスミドDNAを用いて測定を行った。

力価検定法としては、HVJ-Eベクターがアジュバントとして免疫を賦活化する活性を測定するアッセイと、薬効成分である遺伝子発現プラスミドによる目的蛋白質の発現量を測定するアッセイを選択した。免疫の賦活化については、サイトカイン遺伝子の発現を増強するNF- κ B活性化を指標とするアッセイ系を構築して測定を行った。その結果、再現性の高いデータを取得する事が出来たので品質管理試験として適切である事が明らかとなった。また、発現プラスミドの力価検定として、培養細胞に導入後に発現される蛋白質を定量するアッセイを選択し、IL-12についてはELISA法を、HSP65についてはウェスタンブロット法を構築して測定を行った。その結果、構築した発現プラスミドをBHK細胞に導入する事で、目的の蛋白質が発現する事が確認された。

今後、標準操作手順書（SOP）の整備やバリデーションを実施することでアッセイの研究では薬効成分であるプラスミドDNAに関しては遺伝子治療薬のガイドラインに従った品質管理項目を設定して大量製造を行い、HVJ-Eベクターに関しては上記のような力価検定を品質管理項目として追加して検討を行った。

薬効成分であるプラスミドDNAの品質管理項目としては、現段階で必要とされる品質グレードとしては動物試験での薬効評価に使用できる品質レベルであるので、表1に示す管理項目を設定して製造を行った。