

平成17年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究

重点研究報告書

平成17年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究

重点研究報告書

第1分野

先端的創薬技術の開発に関する研究

第2分野

創薬のための生体機能解析に関する研究

第3分野

医薬品等開発のためのレギュラトリーサイエンスに関する研究

第4分野

創薬に係る臨床研究ならびに稀少疾病治療薬等の開発に関する研究

第5分野

健康寿命延伸・予防診断・治療法の開発に関する研究

第6分野

医療材料および製剤設計技術の開発に関する研究

第7分野

ヒト組織を用いた薬物の有効性、安全性に関する研究

目 次

第1分野

課題番号

KH11001	バイオフィotonクスを利用した細胞組織障害を視る、測る、解析する技術の開発	川西 徹 …… 1
KH11002	成長制御機構の解明と成長障害治療法の開発	緒方 勤 …… 11
KH11003	創薬研究基盤としての新規発生工学技術の開発に関する研究(総合研究報告)	松田潤一郎 …… 13
KH11003	創薬研究基盤としての新規発生工学技術の開発に関する研究(平成17年度報告)	松田潤一郎 …… 17
KH12072	変異を克服した画期的抗ウイルス薬の開発	野口博司 …… 25

第2分野

KH21004	動脈硬化症と血栓症にかかわるスフィンゴシン1-リン酸(S1P)受容体(S1P3)の拮抗薬の開発	望月直樹 …… 31
KH21005	遺伝子改変動物を用いた病態関連因子の解明と創薬への応用に関する研究	田上昭人 …… 35
KH21006	病態時の侵害情報伝達に関与するプリン受容体の機能解明	井上和秀 …… 47
KH21007	蛋白立体構造異常を原因とするコンフォメーション病に対する病態解明と創薬探索システムの確立	桃井 隆 …… 58
KH21008	高密度CGHアレイを用いた新規白血病・リンパ腫治療薬の標的分子の探索	小川誠司 …… 66
KH21009	脂質代謝・機能の解明とその抗微生物薬開発への応用	花田賢太郎 …… 70
KH21010	繊維芽細胞の放出するmacrophage活性化因子とJAG1蛋白の関連と臓器繊維化の機序解明	香坂隆夫 …… 77
KH21011	血管におけるレクチンを介する生体防御システムの解明と創薬への応用	若宮伸隆 …… 86
KH21012	コネキシン遺伝子の癌抑制機能の網羅的解析;癌予防および治療への応用	矢野友啓 …… 96
KH21013	免疫グロブリン大量静注療法的作用機序解明と新しい治療標的分子の探索	阿部 淳 …… 102
KH21014	受精および初期胚発生における糖鎖の役割解析とその応用に関する研究	藤本純一郎 …… 108
KH21015	細胞内エネルギー代謝制御分子の機能発現機構の解明と新規治療薬への応用	江崎 治 …… 113
KH21016	過食の病態関連因子の解明と抗過食薬の創薬探索に関する研究(総合研究報告)	野々垣勝則 …… 117
KH21016	過食の病態関連因子の解明と抗過食薬の創薬探索に関する研究(平成17年度報告)	野々垣勝則 …… 120

KH21017	慢性ストレス負荷によるうつ病様病態の発症分子機構の解明と創薬（総合研究報告）	田平 武 …… 124
KH21017	慢性ストレス負荷によるうつ病様病態の発症分子機構の解明と創薬（平成17年度報告）	田平 武 …… 129
KH21018	アルツハイマー病における新規創薬ターゲット検索のための、APP細胞内ドメインの機能解析	中山 耕造 …… 134
KH21019	創薬への応用を目標としたB細胞の分化・増殖・細胞死の制御機構解明に関する研究	上出 利光 …… 142
KH21021	エンドトキシン認識・刺激伝達機構の解明と医療への応用に関する研究	西島 正弘 …… 148
KH21022	ウイルスRNA結合ペプチドを用いたC型肝炎治療薬の開発	鈴木 哲朗 …… 152
KH21023	末梢血幹細胞の分化増殖機構の解明と創薬への応用に関する研究	葛西 正孝 …… 156
KH21101	DNAマイクロアレイによる多発性硬化症の迅速診断法の樹立に関する研究	佐藤 準一 …… 160
KH22073	機能性精神疾患のハイスループットSNPs解析と機能解析による創薬標的分子の解明	功刀 浩 …… 167
第3分野		
KH31024	超難溶性薬物の効率的製剤化に非晶質の特異性を活用する技術とその評価法の確立	吉岡 澄江 …… 175
KH31025	生薬及び漢方処方 of 科学的品質保証に関する研究	合田 幸広 …… 185
KH31026	食中毒細菌の新規迅速検査法の開発とその評価法に関する研究	工藤由起子 …… 194
KH31027	ハイスループット・ヒト型遺伝毒性試験系の構築	能美 健彦 …… 200
KH31028	ヒト肝細胞で置換された肝臓を持つマウスの医薬品開発への利用ー非拘束マウスの胆汁採取分析技術の確立ー	吉里 勝利 …… 210
KH31029	高度分析評価技術を応用した医薬品製剤開発および製造工程管理手法の研究	檜山 行雄 …… 218
KH31030	患者個別化薬物治療のための遺伝子タイピング法及びメタボロミクスの手法の開発に関する研究	斎藤 嘉朗 …… 226
KH31031	細胞医療に用いられる細胞組織利用医薬品の品質・安全性評価技術の開発	山口 照英 …… 235
KH31032	医薬品等の有効性・安全性を保証するための分析・解析技術の評価と標準化に関する研究	林 讓 …… 243
KH31033	医薬品適正使用のためのヒト薬物動態評価法の開発と応用（総合研究報告）	頭金 正博 …… 252
KH31033	医薬品適正使用のためのヒト薬物動態評価法の開発と応用（平成17年度報告）	頭金 正博 …… 257
KH31034	プロテオミクス及び構造生物学的アプローチ等を用いたバイオ医薬品の特性解析・品質評価技術の開発	川崎 ナナ …… 261

KH31035	生物由来製品のウイルス安全性に関する基盤研究	内田恵理子 …… 271
KH31036	臨床薬理学的視点による薬効ゲノム情報活用のための基盤研究	東 純一 …… 281
KH32074	IT技術を用いた低コストかつ高品質な大規模臨床試験実施基盤の構築	永井洋士 …… 288
第4分野		
KH41037	抗フリーラジカル療法を目指した基盤研究と創薬への応用	綱脇祥子 …… 307
KH41038	ボツリヌス神経毒素有効成分を利用したジストニア・痙縮等の治療法の確立と筋萎縮性側索硬化症に対するdrug delivery systemの開発	梶 龍児 …… 315
KH42075	熱帯病・寄生虫症に対する稀少疾病治療薬の輸入・保管・治療体制の開発研究	名和行文 …… 319
第5分野		
KH51039	臍帯血移植患者へのドナーリンパ球輸注療法（DLI）の実用化	藤原成悦 …… 327
KH51040	アレルギーによる室内環境汚染の実態を評価する方法、および汚染の制御方法の開発に関する研究（総合研究報告）	安枝 浩 …… 336
KH51040	アレルギーによる室内環境汚染の実態を評価する方法、および汚染の制御方法の開発に関する研究（平成17年度報告）	安枝 浩 …… 342
KH51041	C型肝炎ウイルスの感染・複製系の確立とその応用による抗ウイルス療法の開発	脇田隆字 …… 349
KH51042	個体特性に着目した食品成分の骨粗鬆症に対する予防効果に関する研究	石見佳子 …… 359
KH51043	食品からの食中毒起因菌の高感度迅速検出法の開発とリスクマネージメントへの応用	山本茂貴 …… 367
KH51044	食品添加物等の新機能性に関する研究	広瀬雅雄 …… 372
KH51045	新規ミスマッチDNA特異的修飾試薬を用いた全ゲノムからの既知および未知の生活習慣病関連遺伝子のSNPs検出システムの開発	池田康行 …… 376
KH51046	気管支喘息、慢性閉塞性肺疾患（COPD）重症化機序の分子細胞システムとしての理解に基づく新たな制御方法の確立に関する研究	松本健治 …… 383
KH51047	呼吸器及び腸管粘膜免疫をターゲットとする新しいワクチンデリバリーの開発（総合研究報告）	竹森利忠 …… 387
KH51047	呼吸器及び腸管粘膜免疫をターゲットとする新しいワクチンデリバリーの開発（平成17年度報告）	竹森利忠 …… 395
KH51048	新しい粘膜アジュバントおよび粘膜ワクチンの開発に関する研究	長谷川秀樹 …… 401
KH51049	バイオテクノロジーによるワクチンの創製と改良技術の開発	松浦善治 …… 406

KH51050	可溶性ウイルス受容体等を利用した抗ウイルス剤の開発に関する研究	田口文広 ……	410
KH51051	ワクチン創生の新テクノロジーと新規ワクチンの開発	小島朝人 ……	418
KH51052	脂質輸送を制御する生活習慣病予防薬開発のための基礎的研究	最上知子 ……	422
KH51054	核酸封入ナノカプセルによるウイルス消毒薬、抗ウイルス薬の創薬に関する研究	武田直和 ……	428
KH51055	siRNA発現ライブラリーによる新興・再興感染症の原因ウイルスの複製に必須な遺伝子の検索および創薬への応用	森川 茂 ……	431
KH51056	プロテインチップ、DNAマイクロアレイ等の新しい技術を用いた診断法の有用性とその評価手法に関する研究（総合研究報告）	鈴木孝昌 ……	437
KH51056	プロテインチップ、DNAマイクロアレイ等の新しい技術を用いた診断法の有用性とその評価手法に関する研究（平成17年度報告）	鈴木孝昌 ……	442
KH51057	血管新生の制御による虚血系疾患治療薬の開発に関する基礎的研究	新見伸吾 ……	452
KH51058	天然抗酸化剤を利用した創薬化学	福原 潔 ……	459
KH51102	内因性幹細胞の動員、生着、心筋分化による重症心不全・再生療法の確立	長谷川浩二 ……	464
KH52076	インフルエンザ治療型単鎖抗体の開発に関する研究（総合研究報告）	浅沼秀樹 ……	466
KH52076	インフルエンザ治療型単鎖抗体の開発に関する研究（平成17年度報告）	浅沼秀樹 ……	471
第6分野			
KH61059	幹細胞等を用いた細胞組織医療機器の開発と評価技術の標準化	土屋利江 ……	479
KH61060	新しい修飾技術を用いた再生医療用生物由来素材の開発	岸田晶夫 ……	500
KH61061	霊長類ES細胞の無フィーダー、無血清培養を用いた新しい未分化維持増殖培養法と血液細胞分化制御系の開発	湯尾 明 ……	511
KH61062	疾患特異的T細胞吸着材の開発（総合研究報告）	澁谷統壽 ……	516
KH61062	疾患特異的T細胞吸着材の開発（平成17年度報告）	澁谷統壽 ……	524
第7分野			
KH71063	臓器移植患者の小腸及び肝組織を用いた遺伝子機能解析に基づくテラーメイド免疫抑制療法法の確立に関する研究	乾 賢一 ……	531
KH71064	ヒト細胞を供給源とした再生医療の早期実現化を目指す有効性、安全性の検証システムの確立	梅澤明弘 ……	540
KH71065	創薬、臨床検査開発のためのヒト組織の有用性に関する研究ーヒト組織バンクの効率的運用のためのネットワーク作りー（総合研究報告）	松浦成昭 ……	548

KH71065	創薬、臨床検査開発のためのヒト組織の有用性に関する研究－ヒト組織バンクの効率的運用のためのネットワーク作り－（平成17年度報告）	松浦成昭 …… 554
KH71066	創薬基盤としての公共的ヒト組織バンクを中心とした肝組織・細胞の研究利用システムの構築	絵野沢 伸 …… 559
KH71067	EBMに基づく医薬品の安全性・有効性を確立するための大規模臨床データに関する学術情報の解析、評価に関する研究（総合研究報告）	森川 馨 …… 569
KH71067	EBMに基づく医薬品の安全性・有効性を確立するための大規模臨床データに関する学術情報の解析、評価に関する研究（平成17年度報告）	森川 馨 …… 575
KH71068	ヒト型遺伝毒性試験系の開発とそのバリデーション	本間正充 …… 591
KH71069	高機能保持ヒト肝細胞組込型細胞チップとナノセンサーによる新薬開発における薬物動態・毒性を評価する新規バイオセンサーの開発	永森静志 …… 601
KH71070	ケミカルゲノミクスによる難治固形癌に有効な主要抗癌剤の薬効貢献分子の探索と発見された分子を標的とする次世代抗癌剤の開発	西尾和人 …… 611
KH71071	外科手術摘出ヒト組織を用いたオーダーメイド医療の研究と遺伝多型を考慮したヒト肝細胞の代謝研究への応用に関する研究	大野泰雄 …… 617
KH72077	ヒト胎盤組織を用いた薬物の胎児移行性及び胎児毒性の定量的評価	澤田康文 …… 628
KH72078	ヒト組織提供医療機関としてのバンクシステム効率化と研究資源高度化に関する研究（総合研究報告）	小林真一 …… 634
KH72078	ヒト組織提供医療機関としてのバンクシステム効率化と研究資源高度化に関する研究（平成17年度報告）	小林真一 …… 640

第5分野

健康寿命延伸・予防診断・治療法の開発に関する研究

ワクチン創生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

研究要旨 我国侵入危険性の高いウエストナイルウイルス(WNV)のワクチン開発が急務となった。そこで、昨年度緊急に開始した WN ワクチン開発を本年度は重点的に実施した。その結果、

- (1) WN 不活化ワクチンの開発に成功した。WNV の我国侵入前に実用化を目指した研究に進展させることが望まれる。
 - (2) 安価な次世代 WN サブユニットワクチン開発では、昨年度の約 10 倍量の WNV 粒子抗原産生を可能にする WNV cDNA 発現シグナル系が開発された。
- 一方、CMV プロモーターの特許権に拘束されない独自の新規 HHV-6 IE プロモーターが見出され(特願 2005-261366)、第3世代ワクチンへの有用性が示唆された。

分担研究者

- (1) 国立感染症研究所・感染病理部 小島 朝人
高橋 秀宗
田中 道子
同 ・ウイルス1部 高崎 智彦
- (2) (財)阪大微生物病研究会 東 雍
- (3) 独立行政法人医薬基盤研究所 山西 弘一

A. 研究目的

WHO は熱帯・亜熱帯地域を視野に「ワクチンの改善・改良・新開発」の提言を行っている。フラビウイルス流行圏外の我国も、温暖化によりその脅威に曝される危険が現実化しつつある。既に米国では、ウエストナイルウイルス(WNV)が1999年突如侵入し、短期間で全土に定着し、さらに北米大陸・カリブ海全域に拡大し、昨年も多数の患者・死者が発生し、流行が終息する気配も無い。

我国でも、2005年に米国渡航者の初症例が報告され、ウラジオストックで鳥からWNVが分離された報告を考え合わせると、極めて強い警戒が必要になっている。しかし、フラビウイルスにはワクチン以外対処法がない。現在、ウマ用の不活化ワクチンとDNAワクチンが米国で認可されているだけで、ヒトのワクチンは無い。従って、WNワクチン開発は急務である。

WNVは日本脳炎ウイルス(JEV)血清型に属する同属ウイルスであるため、我々のJEワクチン開発の方策と技術を生かす時である。そこで、昨年度

緊急に開始した WN ワクチン開発を、本年度は重点的に実施する事を目的とした。即ち、①阪大研究会が、開発に成功した不活化新 JE ワクチンに準じて、製造用 WNV の性状を調査すると共に不活化 WN ワクチンを試験製造し、有効性を検討する。②同時に別途、JE血清型群ウイルスに対する交叉反応を検討し、不活化 WN ワクチンの有効性を詳細に調査する。また、③前期の JE サブユニットワクチン製造法(官民共同出願済)を基盤に、安全/安価な次世代 WN サブユニットワクチン開発に取り組む、事を目的とした。

他方、未来ワクチンの代表たるDNAや新組換えワクチン開発の障壁が、サイトメガロウイルス(CMV)プロモーターの特許権による拘束にある。これに代わり且つ超えるプロモーターの開発は極めて波及効果の高い目標である。従って、免疫担当細胞で高率且つ特異的に抗原を発現できるヒトヘルペスウイルス6(HHV-6)の前初期(IE)遺伝子プロモーター(2005年出願済)研究は、独自の新規プロモーター開発として継続して実施する。

B. 研究方法

- (1) WN 不活化ワクチンの開発 : ①製造用種ウイルス : WNV NY99-35262 株を Vero 細胞で 3 回ブラックローニングした後 Vero 細胞で増殖させ種ウイルスを調製した。マイクロキャリアに付着・増殖させた Vero 細胞に種 WNV を接種し、ウイルス増殖をブラック法による感染価とガチョウ赤血球の

凝集価で測定した。抗原含量は上記凝集価と昨年度報告の Mab402(保井孝太郎博士より分与)を用いた抗原 ELISA 価で調査した。②ウイルスの不活化と精製：調製した WNV 浮遊液にホルマリンを 1/1000~1/8000 量添加し、4℃における不活化曲線をブラック法による感染価で求めた。不活化の完了した WNV 浮遊液から蔗糖濃度勾配超遠心を 2 回繰り返してウイルスを精製し、試作ワクチンを作製した。③マウス免疫実験：試作 WN ワクチン或いは JE ワクチンを ddY 又は DDY マウス腹腔内に 1 週間隔で 2 回免疫し、2 回目免疫の 1 週後に血清を採取した。抗-フラビウイルス抗体の誘導は、血清中の中和抗体価、赤血球凝集抑制抗体(HI 抗体)価、及び間接蛍光抗体(IFA 抗体)価を測定して評価した。中和抗体価は Vero 細胞を用いた 50%ブラック減少法で、HI 抗体価は WNV HA 活性至適 pH の 6.4 で常法により測定した。IFA 抗体価はカバーガラス上で培養した WNV 感染 Vero 細胞を用いて陽性反応を示す血清最高稀釈倍数を抗体価とした。④ウイルス交叉中和試験：JE 血清型群に属するウイルスとして、WNV NY99-6922 株、Eg101 株、FCG 株、g2266 株；クンジンウイルス OR393 株；JEV Beijing-1 株、Nakayama 株、Hiroshima/25 株、Chiba/88 株；セントルイス脳炎ウイルス Parton 株；マレーバレー脳炎ウイルス 1/51 株；フラビウイルスのプロトタイプである黄熱ウイルス 17D 株、を用いた。各ウイルスのウイルス力価を Vero 細胞を用いたブラック法で算出し、それぞれ 2,000PFU/ml のウイルスを中和試験に用いた。⑤ワクチン抗原の電子顕微鏡観察：免疫に用いた WN 不活化ワクチンをネガティブ染色し、透過型電子顕微鏡を用いて観察を行った。

(2) WN サブユニットワクチンの開発：①WNV 抗原の発現解析：分泌シグナル配列-prM-E 遺伝子領域の cDNA を発現する昨年度の pW6&7' ベクターを対照にして、我々の WNV 粒子形成・分泌機構解析から選別された高効率分泌シグナルを有する pWN#6 発現ベクターを構築して解析した。発現ベクターを 293T 細胞にトランスフェクトし、培養上清及びその超遠心沈降画分を調整した。上清・沈降画分中の WNV 抗原を 402 抗原 ELISA で測定し、WNV 抗原の産生・分泌を検討した。超遠心沈降画分及び細胞抽出液については、フラビ交叉反応性抗-JEV 抗体及び抗-WNV/M 抗体を用いたウエスタンブロットで解析した。②発現抗原の輸送・分泌・形態の解析：pWN#6 中の WNV cDNA に EGFP cDNA を連結し、融合蛋白の蛍光を指標に WNV 抗原の細胞内分布・局在を解析した。また、培養上清 100ml から超遠心濃縮した WNV 抗原を 20-60%平衡蔗糖密度勾

配遠心法で解析し、抗原ピークの画分を限外濾過濃縮した。これをネガティブ染色し電子顕微鏡で抗原の形態を観察した。

(3) 新テクノロジーの開発：DNA ワクチン用新規プロモーターの開発：HHV-6 がコードする 2 種類の IE 遺伝子(MIE と U95)のプロモーター領域を、ホタルルシフェラーゼ遺伝子上流に組み込んだレポータープラスミドを用い、末梢血単核球(PBMC)および樹状細胞、マクロファージにおける活性を測定した。これらの細胞に遺伝子導入を行い、24 時間後にルシフェラーゼ活性を測定した。比較対象としてサイトメガロウイルス(CMV)の IE プロモーターを用いた。

(倫理面への配慮)

ヒト検体を用いる場合は、疫学研究および臨床研究に関する倫理指針を遵守し、医薬基盤研究所における倫理委員会において承認を得た上で研究を遂行した。マウスを用いた動物実験は動物倫理規程に則り、当該研究機関において申請・承認を受けた方法で実施した。即ち、必要最小限のマウス数を使用し、採血時にはマウスに対して麻酔処置を施して負担を最大限軽減し、実験終了後は安楽殺の処置を行った。

C. 研究結果

(1) WN 不活化ワクチンの開発

①製造用種ウイルス：マイクロキャリア上の Vero 細胞に $moi \approx 0.1$ で感染させた WNV の増殖は、接種後 2 日目に $10^{9.0}$ PFU/ml 以上の最も高い感染価を示し、以後低下した。抗原量の指標となる HA 価はウイルス接種後 3 日目で 256 倍と最高値を示し、ELISA 価もウイルス接種後 3 日目で 244 単位(自家参照品を 100 とした相対値)と最高値を示した。Vero 細胞で増殖させた WNV は、ガチョウ赤血球を凝集し、その至適 pH は 6.4 であることも確認された。

②ウイルスの不活化：WNV 浮遊液の 4℃/ホルマリン添加による不活化条件を検討した。ホルマリンを WNV 浮遊液の 1/1000 量添加した場合 28 日間で感染価は検出されなくなったが、1/2000 量以下の場合には 36 日間でも不活化が完全に行われなことが判明した。

③マウス免疫実験：試作 WN ワクチン及び JEV ワクチンを 2 段階希釈して腹腔内接種した ddY マウス 10 匹のプール血清について、WNV 又は JEV に対する抗体価を検討した。WN ワクチン接種群では、WNV に対する中和抗体価、HI 抗体価及び IFA 抗体価は、接種した抗原の量に相関し、最高抗原量の

62.5ng 接種群の中和抗体価は $10^{2.81}$ 倍を示した。このとき、JEV に対する中和抗体価は $10^{1.59}$ 倍を示した。

一方、JE ワクチン 62.5ng を接種したマウスの JEV に対する中和抗体価は $10^{3.75}$ 倍にも達したが、WNV に対する中和抗体価は $10^{1.13}$ 倍、HI 抗体価は 20 倍であった。これに対して IFA 抗体価は 640 倍と高い交叉反応性を示した。

次に、WN ワクチンと JE ワクチンを混合して接種した場合には、いずれの抗体価も、其々単独の単味ワクチンとして接種した上記の場合の抗体価と同等の高い値を示した。

④ウイルス交叉中和試験：1)交叉中和抗体の誘導：WN 不活化ワクチンの有効性を詳細に検討するため、ワクチン接種 DDY マウスの JE 血清型群フラビウイルスに対する交叉中和抗体価誘導を調査した。WN ワクチン接種群では、WNV NY99-6922 株、Eg101 株、FCG 株、g2266 株；クンジンウイルス OR393 株；JEV Beijing-1 株、Nakayama-NIH 株；マレーバレー脳炎ウイルス 1/51 株、に対する中和抗体が誘導された。一方、JE ワクチン接種群は、JEV Beijing-1 株、Hiroshima/25 株；クンジンウイルス OR393 株に対する中和抗体が誘導されたものの、その他の WNV に対する中和抗体は誘導されなかった。2)相対力価：WN ワクチン接種群で誘導された中和抗体の WNV NY99-6922 株に対する WNV Eg101 株、g2266 株、FCG 株；JEV Beijing-1 株の相対力価を、平行線定量法によってコンピューター解析したところ、WNV NY99-6922 株に対する相対力価はそれぞれ 51.7%、17.7%、17.0%；0.06%であった。

⑤WN ワクチン抗原の形態：上記のように、高い有効性を示す WN ワクチン抗原の電子顕微鏡観察をネガティブ染色で行った。その結果、ウイルス粒子構造が良く保存されている直径約 50nm の球形形像が観察された。

(2) WN サブユニットワクチンの開発

①WNV 抗原の発現解析：今年度構築した pWN#6 発現ベクターは、昨年度の pW6&7' ベクターに比べて、培養上清中に約 10 倍の WNV 抗原を産生・放出できる高産能を有していることが、抗原 ELISA により判明した。両ベクターとも、細胞内で発現する WNV 蛋白は E、prM、M であった。しかし、量的に 10 倍という顕著な差を示す違いはウエスタンブロットでは認められなかった。これに対して、超遠心沈降画分のウエスタンブロットでは、各 WNV 蛋白バンドのシグナルが、pWN#6 発現ベクターでは著しく増強していた。しかし、質的には E、prM、M 蛋白からなる抗原であることは両ベクターで共通していた。

②発現抗原の輸送・分泌・形態解析：pWN#6 が発現する WNV 抗原と EGFP の融合蛋白は細胞質内でネットワーク状に分布しており、分泌器官であるゴルジと考えられる部位に集積していることが示唆された。培養上清中に放出された WNV 抗原は、平衡蔗糖密度勾配遠心法によって単一のピークを形成した。このピーク画分から回収された WNV 抗原は、ネガティブ染色による電子顕微鏡観察では直径約 25 nm の球形の粒子様構造を示した。

(3)新テクノロジーの開発：DNA ワクチン用新規プロモーターの開発

独自に開発した HHV-6 プロモーターのヒト血球細胞における活性を検討した。PBMC においては CMV プロモーターが最強であったものの、HHV-6 MIE 及び U95 プロモーターも CMV の 60-140%程度の活性を示しており、遜色はなかった。また、樹状細胞においても CMV プロモーターの活性が最も強かったが、マクロファージでは逆に HHV-6 MIE プロモーターの活性が CMV のそれを上回った。

D. 考察

WN 脳炎は一旦発症すると致死率が高く回復しても重度の後遺症を伴う場合が多い。ロシアの患者発生地域も東進し日本海沿岸に達した。WNV は野鳥と蚊の間で感染環が成立しており、感染野鳥が我国に飛来した場合は、JEV による脳炎と異なり、都会での大流行が懸念される。我国には JEV が土着しており、JE ワクチンによる基礎免疫保持者は多い。現在 WN ワクチンが存在しないため、JE 血清型の WNV に対して JE 免疫が有効か否かも重要な問題である。そこで、前期報告の JE 不活化新ワクチンに準じて、阪大微研会が現在緊急に開発中の WN 不活化ワクチンの有効性について、JE ワクチンを対照に検討した。

WN ワクチン製造の素となる種ウイルス NY-99 株は、JE ワクチン製造種ウイルスである Beijing 株より Vero 細胞における増殖性が高い利点が見された。ガチョウ赤血球凝集活性も至適 pH の 6.4 を維持していたことからウイルス HA の生物活性は維持されていると考えられる。一方、ホルマリンによる不活化試験では JEV に比較してやや長期間を要したことからホルマリンに対する抵抗性は高いと思われ、十分な不活化処理が重要であろう。他方、不活化後も直径 50nm の球形構造が良く保存されたウイルス粒子として観察されたことから、製造過程に問題の無いことも示唆された。

このような検討を踏まえて試作された WN 不活化ワクチンは、62.5ng と少ない蛋白質含量でも高い WNV 中和抗体価を誘導し、この抗体は低いなが

ら JEV の中和活性も有していた。この点に関して詳細な交叉中和試験を実施し、試作 WN ワクチンは世界で流行中の多くの WNV 株及びサブタイプのクンジンウイルスに対して有効であることが示された。従って、WN 試作ワクチンは米国で流行中の WN 熱・脳炎予防に有効と考えられ、我国侵入前に実用化研究への速やかな進展が望まれる。

一方、JE ワクチンでは WNV 交叉中和抗体の誘導が観察されなかったため、現在普及している JE ワクチンの WN 熱・脳炎に対する高い予防効果は期待薄と思われる。しかし、WN ワクチンと JE ワクチンを混合した場合は、夫々単独でワクチン接種した場合と同等の抗体価を WNV に対しても JEV に対しても示したことから、JEV が未だ土着している我国においては、WNV/JEV の両者に有効な 2 価混合ワクチンとして有望であることが示唆された。

不活化ワクチンの次の安価/安全な WN サブユニットワクチン開発では、WNV 粒子抗原発現ベクターの抗原産生効率が価格を大きく左右する。WNV の粒子形成・分泌機構に関する我々の解析で、シグナルシーケンスが粒子産生効率に大きな影響を与えることが判明したことから、昨年度の WNV 粒子抗原発現ベクターの改良を行った。その結果、培養液中に約 10 倍量の WNV 抗原を産生する cDNA 発現シグナル系が開発された。高発現シグナルを有する融合蛋白は分泌器官であるゴルジに集積することが示され、培地中に分泌された WNV 抗原は E, prM, M 蛋白からなる粒子状抗原であることが電子顕微鏡観察等で示唆された。来年度の WNV 粒子抗原高産生細胞株樹立計画の基盤を整備できたものと思われる。

新テクノロジーの開発では、阪大から基盤研へと継続してきた独自の研究により、CMV プロモーターに対置できる新規 IE プロモーターが見出された(特願 2005-261366)。HHV-6 MIE プロモーターが抗原提示細胞である樹状細胞やマクロファージで一定の活性を示したため、ワクチン用プロモーターとして期待される。しかし、PBMC 或いは PBMC 由来樹状細胞・マクロファージは、個体差によるトランスフェクション効率やプロモーター活性の変化が大きい。従って、ヒトワクチン用プロモーターとしては個体例数を増やして検討を加える必要があろう。CMV プロモーターの特許権に拘束されない第 3 世代ワクチン開発へと、波及効果の高い、且つ、独自性の高い研究であるので、継続的な実施が重要であろう。

E. 結論

昨年度緊急に開始した WN ワクチン開発を本年

度は重点的に実施した。その結果、

(1) WN 不活化ワクチンの開発に成功した。WNV の我国侵入前に実用化を目指した研究に進展させることが望まれる。

(2) 安価な次世代 WN サブユニットワクチン開発では、昨年度の約 10 倍量の WNV 粒子抗原産生を可能にする WNV cDNA 発現シグナル系が開発された。

一方、CMV プロモーターの特許権に拘束されない独自の新規 HHV-6 IE プロモーターが見出され(特願 2005-261366)、第 3 世代ワクチンへの有用性が示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

Kuwayama M, Ito M, Takao S, Shimazu, Y, Fukuda S, Miyazaki K, Kurane I, Takasaki T. Japanese encephalitis virus in meningitis patients, Japan. *Emerg. Infect. Diseases* 11: 471-473, 2005.

Tajima, S., Takasaki, T., Matsuno, S., Nakayama, M., Kurane, I. Genetic characterization of Yokose virus, a flavivirus isolated from the bat in Japan. *Virology* 332: 38-44, 2005.

2. 学会発表

Lim C, Takasaki T, Kotaki A, Nerome R, Ito M, Tajima S, Morita K, Ishikawa T, Kurane I. Mouse antibody response to inactivated West Nile and inactivated Japanese encephalitis vaccines for immunization against West Nile virus and other flaviviruses. 2006 National Conference on West Nile Virus in the United States (San Francisco), 2006.

林 昌宏, 高崎智彦, 小滝 徹, 根路銘令子, 伊藤美佳子, 田島 茂, 森田公一, 石川豊数, 倉根一郎. ウエストナイル不活化ワクチンの日本脳炎血清型群ウイルスに対する交差反応の検討. 第 53 回日本ウイルス学会総会(横浜), 2005.

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許出願

特願 2005-261366 : (発明者) 武本眞清、森 康子、山西弘一、福家 功、五味康行、高橋理明; リンパ球・血球系細胞へ遺伝子導入するためのプロモーターおよびその利用方法; (出願日)2005 年 9 月 8 日。

2. 実用新案登録: 該当事項なし。

3. その他: 該当事項なし。

平成17年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究
重点研究報告書

平成18年7月31日発行

発行 財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団

〒103-0001 東京都中央区日本橋小伝馬町13番4号
共同ビル（小伝馬町駅前）4F
電話 03(3663)8641 FAX 03(3663)0448

印刷 株式会社 ソーラン社