

N.

Substrate specificities of calicivirus-encoded 3C-like proteases
The Forum of the Network of Research Centers on Infectious Diseases、ベトナム、2008年10月6日

3) 岡 智一郎、横山 勝、片山 和彦、恒光裕、山本 真民、宮下 佳奈、本村 和嗣、守宏美、中村浩美、脇田隆宇、佐藤裕徳、武田直和

カリシウイルスプロテアーゼの基質認識に影響する切断部位上流アミノ酸残基の解析
第56回日本ウイルス学会、岡山、2008年10月26-28日.

4) 横山勝、岡智一郎、片山和彦、山本真民、宮下佳奈、神田忠仁、武田直和、佐藤裕徳
サポウイルスプロテアーゼの基質認識に関するアミノ酸残基の解析

第56回日本ウイルス学会、岡山、2008年10月26-28日.

5) 片山和彦、岡智一郎、脇田隆宇、武田直和
リバースジェネティクスを利用したノロウイルスの病原性発現機構の解析

第56回日本ウイルス学会、岡山、2008年10月26-28日.

6) 小澤一弘、岡智一郎、片山和彦、本村和嗣、中村浩美、守宏美、佐藤裕徳、武田直和

「調理従事者を対象としたノロウイルスの網羅的検出調査」

第56回日本ウイルス学会、岡山、2008年10月26-28日.

7) 本村和嗣、横山勝、岡智一郎、中村浩美、守宏美、Hansman Grant、片山和彦、田中智之、真崎宏則、星野和彦、蒔本恭、秋山美穂、木村

博一、神田忠仁、武田直和、佐藤裕徳

「ノロウイルスの免疫淘汰と周期的流行の分子機序」

第56回日本ウイルス学会、岡山、2008年10月26-28日.

8) 岡 智一郎、横山 勝、片山 和彦、恒光裕、山本 真民、宮下 佳奈、本村和嗣、脇田隆宇、佐藤 裕徳、武田 直和

「カリシウイルスプロテアーゼの活性発現に重要なアミノ酸残基の解析」

第81回日本生化学会大会・第31回日本分子生物学会年会合同大会神戸、2008年12月9-12日

9) 横山 勝、岡 智一郎、片山 和彦、神田 忠仁、武田 直和、佐藤 裕徳

「カリシウイルスプロテアーゼ分子モデルによる基質認識の解析」

第81回日本生化学会大会・第31回日本分子生物学会年会合同大会、神戸、2008年12月9-12日

10) 片山和彦、岡智一郎、脇田隆宇、武田直和

「ノロウイルスプロテアーゼを利用したノロウイルスリバースジェネティクスシステムの制御」

第81回日本生化学会大会・第31回日本分子生物学会年会合同大会、神戸、2008年12月9-12日

E. 知的財産権の出願・登録状況

特許および実用新案登録など、本年度は無し。

家族性黄斑変性カニクイザルを用いた加齢黄斑変性の 新規治療及び予防薬の開発

所 属 独立行政法人医薬基盤研究所

研究者 寺尾 恵治

研究期間 平成 18 年 4 月～平成 21 年 3 月

研究要旨

遺伝的に加齢黄斑変性疾患(AMD)を自然発症するカニクイザルを用いた薬効評価系を確立し、国際的競争力のある新規治療及び予防薬候補物質の開発を行うことを目的とする。アキュメンバイオフーマ株式会社から AMD の新規治療薬候補物質として既知の「Rho-kinase 阻害剤 X」の提供を受けて、九州大学大学院医学研究院眼科学分野と共同で開発を進めた。抗炎症作用と血管新生抑制作用を併せ持つ Rho-kinase 阻害剤 X を AMD の新規治療薬として開発する目的で、初代培養系およびマウスを用いて網膜における薬理作用を確認した。DDS の最適化を目的として徐放製剤を試作し、網膜黄斑変性カニクイザルの硝子体に投与して、Rho-kinase 阻害剤 X の安全性と有効性を評価した。3ヶ月の観察期間では顕著な毒性は認められなかったが、治療効果を確認するには至らなかった。その要因として、第一世代の徐放化製剤の溶出速度が予想以上に速く、Rho-kinase 阻害剤 X の抗炎症作用、血管新生抑制作用に有効な濃度が長期間維持できなかったことがあげられる。徐放製剤の改良が急務であり、優れた徐放製剤が開発できれば、唯一のモデル動物である黄斑変性カニクイザルが独占使用できる利点を生かして、国際競争力のある新規 AMD 治療薬の実用化を促進することが可能となる。

研究分担者

- (1)アキュメンバイオフーマ 鍵本忠尚
- (2)九州大学大学院、医学研究院眼科学
石橋達朗
- (3)九州大学大学院、医学研究院眼科学
畑 快右

A. 研究目的

加齢性網膜黄斑変性症(AMD)は欧米で高齢失明の最大原因であり、日本でも緑内障、糖尿病網膜症に次ぐ中途失明の要因となっている。AMD は加齢を元に発生する後局所の網膜-色素上皮-脈絡膜複合体のさまざまな病変のことで、脈絡膜新生血管を伴う Wet 型と伴わない Dry 型に分けられる。AMD アライアンス・インターナショナルの推定では、毎年世界で 50 万人が新たに AMD との診断を受け、世界の 2500-3000 万人が AMD の疑いがある。今後、日本を含む先進国各国で高齢化が進むことは確実であり、高齢者の QOL を支える観点から AMD 治療薬の開発は急務である。医薬基盤研究所・霊長類医学科学研究センターで見いだされた若年性網膜黄斑変性家系は、ヒトの加齢性網膜黄斑変性症の唯一のモデル動物であり、本研究は、AMD 疾患を自然発症するカニクイザルを用いて薬効評価系を確立し、AMD の新規治療薬として

Rho-kinase 阻害剤 X(以下 Rho 阻害剤 X)の臨床応用を目的とした有効性および安全性評価試験を実施する。

B. 研究方法

A: Rho 阻害剤 X の薬理作用確認

本研究で開発対象としている Rho 阻害剤 X の血管新生阻害作用をウシ網膜周皮細胞の初代培養系およびマウスを用い解析した。in vitro の系では初代培養したウシ網膜周皮細胞を用いて、VEGF で誘導されるミオシン軽鎖のリン酸化と細胞増殖に及ぼす Rho 阻害剤 X の阻害作用を western blotting と TdR の取り込みにより評価した。in vivo の系では、マウスを用いて VEGF で誘導される血管新生への Rho 阻害剤 X 添加の影響を調査した。

B: Rho 阻害剤 X の DDS (徐放化製剤の作成)

臨床治療における DDS の最適化を図るため、硝子体内に埋植もしくは投与する徐放化製剤の作成を試み、Rho 阻害剤 X 封入 PLA 粒子および Rho 阻害剤 X PLA 徐放製剤を試作した。

C: 徐放化 Rho 阻害剤 X のバリデーションと溶出速度

Rho 阻害剤 X の溶出速度および硝子体から前房水への移行速度を推定するため、ウサギ硝子体に異なる濃度の PLA 徐放製剤を投与し、5、10、15 日目に

安楽殺して前房水中および硝子体液中の薬物濃度を測定した。同時にウサギ硝子体液を用いたバリデーション試験を実施した。

正常カニクイザル硝子体内に異なる濃度の PLA 徐放製剤を投与し、投与後一ヶ月目に安楽殺し、硝子体中の薬物濃度を測定した。

硝子体中の薬物測定は採取した硝子体液を遠心し、上清を硝子体中に放出された薬物濃度測定に、沈殿物を硝子体内に残存した徐放製剤の薬物濃度測定に供した。

D: AMD 発症カニクイザルを用いた徐放化 Rho 阻害剤 X 硝子体投与の薬効評価

医薬基盤研究所・霊長類医科学研究センターで維持されている網膜黄斑変性家系のうち、眼底観察により発症を確認した9頭を3頭ずつ3群に分け、それぞれ PLA 徐放製剤の投与量を高濃度 (Rho 阻害剤 X 含量 1.68mg)、低濃度 (同 0.56mg)、非含有 (徐放化剤のみ) の条件で硝子体内に投与した (詳細表 1)。徐放製剤投与後、2 週、1 ヶ月、2 ヶ月、3 ヶ月後に前房水を採取した。投与後 3 ヶ月目に各群 2 頭を安楽殺し、硝子体液採取と組織解析をおこなった。

徐放化 Rho 阻害剤 X 投与の治療効果を評価する目的で、薬物投与前、投与後 2 週、1 ヶ月、2 ヶ月、3 ヶ月目に蛍光眼底撮影と ERG 測定を行った。

E: AMD 発症カニクイザルを用いた徐放化 Rho 阻害剤 X 硝子体投与の安全性評価

PLA 徐放製剤投与の安全性を評価するため、薬剤投与眼での炎症の有無、眼圧測定、血漿中の Rho 阻害剤 X 濃度、血液および血清生化学検査、尿検査、食餌量、体重、活動性について、毎日もしくは 2~4 週間隔で測定・観察した。組織染色により薬物を投与したサル網膜への影響を調査した。

F: 倫理面への配慮

実験動物への徐放化剤の硝子体投与手術、前房水採取、眼圧測定、ERG 測定、安楽殺などの侵襲を伴う実験処置については、眼科領域における実験指針 (ARVO) を遵守するとともに、医薬基盤研究所および九州大学の動物実験委員会による実験プロトコルの承認を前提とした。

C/D. 研究結果および考察

A: Rho 阻害剤 X の薬理作用確認

ウシ網膜周皮細胞の初代培養系に VEGF を添加して誘導されるミオシン軽鎖のリン酸化は Rho 阻害剤 X 添加により完全に阻害された (図 1)。Rho 阻害剤 X は VEGF で誘導されるマウス角膜での血管新生をほぼ完全に抑制した (図 2) ことから、同剤が網膜組織で

優れた抗炎症作用および血管新生抑制作用を示すことが確認された。(分担: 石橋、畑、鍵本)

B: Rho 阻害剤 X の製剤化 (徐放化製剤の作成)

PLA-0015 (重量平均分子量 15,000) を基材として Rho 阻害剤 X 含量が 4~5% の封入 PLA 粒子もしくは PLA 徐放製剤を作成した。(分担: 鍵本)

C: 徐放製剤の in-vivo 溶出試験 (徐放性確認)

ウサギ硝子体へ Rho 阻害剤 X 徐放製剤 (20 mg/100ml) を投与した場合の前房水中の Rho 阻害剤 X 及びその活性体 (M3) の投与後 5、10、15 日目の平均濃度は、それぞれ 0.042、0.026、0.074 mM であった。50 mg/100ml を投与した場合には、それぞれ、0.09、0.14、0.13 mM であった。一方、硝子体中の濃度は、20mg/100ml を投与した場合、それぞれ 29 (5 日)、55 (10 日)、22.5 (15 日) mM で、50mg/100ml の場合では、それぞれ 30、126、41 mM であった。

前房水中と硝子体中の濃度差が大きいことから、Rho 阻害剤 X 測定のバリデーションとしてウサギ硝子体液に溶解した阻害剤の添加回収試験を行った結果、測定法には問題ないことが判明した。この結果からサルの硝子体に 11.7mg の徐放製剤を投与すれば、硝子体中の薬物濃度が 10mM を維持できると判断した (硝子体容積: ウサギ 2ml、サル 4ml と仮定)。先行実験により Rho 阻害剤 X が眼内のサイトカイン産生やアポトーシスを抑制する最適濃度が 20mM と報告されていることから、サルへの投与実験では硝子体内での Rho 阻害剤 X 濃度を 10 mM または 30 mM で維持することとした。前述の積算法に基づき、それぞれの製剤投与量を 11.7mg および 35mg とした。

正常カニクイザルの硝子体内に 35mg の徐放化製剤を投与し、一ヶ月後の安楽殺時の硝子体中の Rho 阻害剤 X 及びその活性体濃度 (上清中) を測定したところ、1.79 および 0.93mM であった。さらに投与一ヶ月後に硝子体内に残存している製剤中の薬物濃度 (沈殿物中濃度) が 0.16 および 0.05mM となったことから、カニクイザルでは投与一ヶ月で薬物の徐放がほぼ完了することが判明した。(分担: 石橋、畑、鍵本)。

E: 徐放化 Rho 阻害剤 X 硝子体投与の薬効評価

表 1 に供試動物と投与の概略を示す。左右眼で黄斑部の変性スポット数に顕著な差のないカニクイザル 9 頭 (雄 3 頭、雌 6 頭) の右眼硝子体に Rho 阻害剤 X 4.8% 含有 PLA 徐放製剤を 11.7mg (低濃度群 3 頭) および 35mg (高濃度群 3 頭) 投与した。左眼は無処置とした。

表 2、3 に投与後の前房水中および硝子体中 (3 ヶ月のみ) の薬物濃度を示す。前房水中の Rho 阻害剤 X 及びその活性体濃度は、徐放製剤の投与量に関わらず、投与後 2 週間でピークを迎えて約 0.41mM となり、その後徐々に低下して投与 2 ヶ月以降は検出

限界以下のサンプルも見られた。硝子体中の Rho 阻害剤 X 及びその活性体濃度は投与後 3 ヶ月目に 2 頭で測定した結果、それぞれ 0.99 および 0.52mM であった。硝子体中の残存製剤濃度がそれぞれ 0.29 および 0.10mM であったことから、投与 3 ヶ月目には薬物の徐放化がほぼ完了していることが推測された。

硝子体内に投与した徐放化 Rho 阻害剤 X が血流を介して全身に流出することによる全身影響の有無を確認するため、投与後 2 週、1 ヶ月、2 ヶ月、3 ヶ月目に採取した血清について Rho 阻害剤 X およびその活性体濃度を測定したところ、いずれも検出限界 (<5ng/ml) であったことから、Rho 阻害剤 X 含有 PLA 徐放製剤の硝子体内投与では少なくとも 2 週目以降においては全身への影響は想定できないと判断した。

網膜黄斑変性発症カニクイザルへの Rho 阻害剤 X 徐放製剤投与が視覚機能、病変部形態および網膜組織に及ぼす影響を、ERG 測定、通常及び蛍光眼底撮影、摘出眼球の免疫組織学的検査により評価した。

ERG 所見: 投与前、投与後 2 週、1 ヶ月、2 ヶ月、3 ヶ月目に Rod, Flash ERG (Ops), cone, 30Hz の ERG を測定した結果、Rod b 波振幅幅、Flash a 波振幅幅、Flash b 波振幅幅の測定値で、プラシーボ投与群での測定値が徐々に低下する傾向を示すのに対し、高濃度投与群で一時期上昇する傾向が認められたが、改善傾向とは判断しがたいことから Rho 阻害剤 X 投与による機能改善を確言し得ない。なお、黄斑部の機能を詳細に解析するためには、局所 ERG 測定が有効であるが、今回使用した軽度の黄斑変性カニクイザルでは一部を除いて局所 ERG 解析が不可能であることから、今後黄斑部の機能解析に有効な方法を確立する必要がある。

蛍光眼底撮影: 投与後 1、2 ヶ月目の蛍光眼底撮影によりドルーゼン (スポット) のサイズおよび数を観察した結果、プラシーボ投与群を含めいずれもスポットのサイズおよび個数には変化が認められなかった。なお、一部の個体で投与後 2 ヶ月目に残存徐放剤に起因する硝子体白濁が認められた。

免疫組織学的解析: 投与後 3 ヶ月目に摘出した眼球を用いて網膜の TUNEL 染色を行った結果、明らかな TUNEL 陽性細胞は検出できなかった (図 3)。このことから、Rho 阻害剤 X 投与による網膜への影響は極めて少ないと判断できる。なお、ドルーゼンを含む黄斑変性部位の病理組織学的検索は現在継続中であり、最終結果をまとめて公表する予定である。(分担: 石橋、畑、鍵本、寺尾)。

F: 徐放化 Rho 阻害剤 X 硝子体投与の安全性評価

徐放化 Rho 阻害剤 X の硝子体投与の安全性に関する調査結果の一部は前項で記述した。その他の安全性評価指標について述べる。

眼圧変化: プラシーボ投与個体の眼圧をコントロールとして眼圧変化を評価した結果、Rho 阻害剤 X 含有徐放製剤を投与した群において、薬物投与による眼圧の影響は見られなかった。左眼 (薬物投与眼) と右眼 (無処置眼) の眼圧下降度を比較した結果では、Rho 阻害剤 X 含有 PLA 徐放製剤による眼圧下降効果はみられなかった。

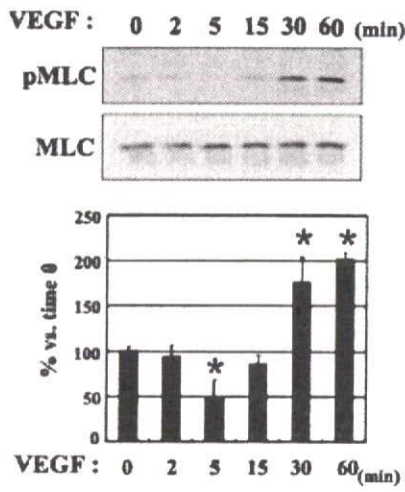
血液・血清生化学・尿検査: Rho 阻害剤 X 含有 PLA 徐放製剤を硝子体投与したサルで投与後継時的に CRP、白血球数、赤血球数、血漿板数、クレアチニン、AST、ALT、アルブミン、 γ -GTP、血漿タンパク、ブドウ糖、コレステロール、トリグリセリド、ビリルビン、尿素窒素、電解質 (Na、K、塩素)、尿ではウロビリノゲン、タンパク、pH、潜血、比重、ケトン体、ビリルビン、ブドウ糖を検査した結果、製剤投与に起因する検査値異常は見られなかった。さらに食餌量、飲水量、活動性にもほとんど変化が見られなかったことから、今回用いた量の Rho 阻害剤 X 含有 PLA 徐放製剤の硝子体投与では全身的な一般毒性が極めて低いと判断した。(分担: 石橋、畑、鍵本、寺尾)

E. 評価

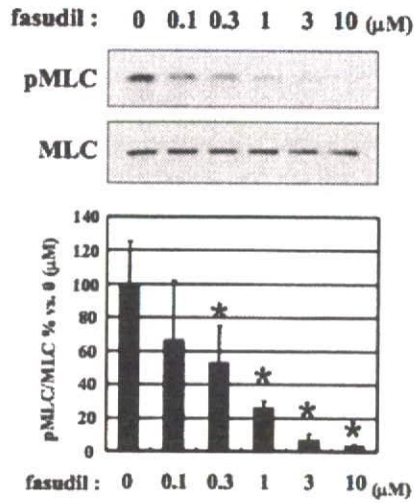
1) 達成度: AMD におけるドルーゼン形成のトリガーとなる炎症反応を抑制し、AMD の病態進行に重要な病変部での血管新生抑制という二重の薬理作用を示す Rho 阻害剤 X の実用化を目的として研究を進めた。薬理作用確認、徐放製剤作成、DDS 開発、薬効評価、安全性評価、治療プロトコルと新薬開発における非臨床試験プロセスをほぼ完結した。一方、Rho 阻害剤 X の徐放化作業に予想外の時間と経費を費やした。加えて、作成した徐放製剤の溶出速度が予想以上に速かったことから、最終的な目標としていたモデルザルを用いた薬効評価実験を短期間 (3 ヶ月) で終了せざるを得ない状況となった。長期的発症プロセスをたどる AMD への治療効果を 3 ヶ月で評価するのは不可能であったが、今回試みた治療プロトコル (Rho 阻害剤 X 含有 PLA 徐放製剤の硝子体内投与) では少なくとも 2 週目以降においては全身への影響は無いことが判明した。

2) 研究の意義と今後の展望: AMD の進行要因に関わる Rho 阻害剤 X の有効性は実証できたことから、今後長期間徐放が持続する製剤が開発できれば、唯一のモデル動物である黄斑変性カニクイザルを維持している利点を生かして、国際競争力のある新規医薬品の実用化を促進することが可能となる。

(Figure 1A)



(Figure 1B)



(Figure 1C)

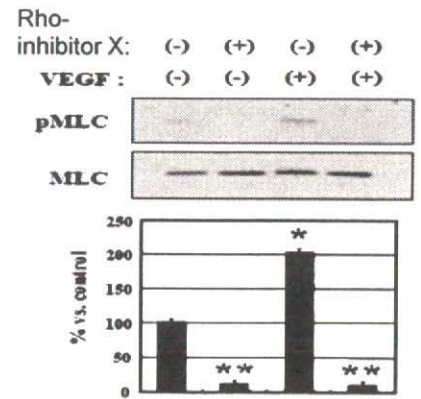
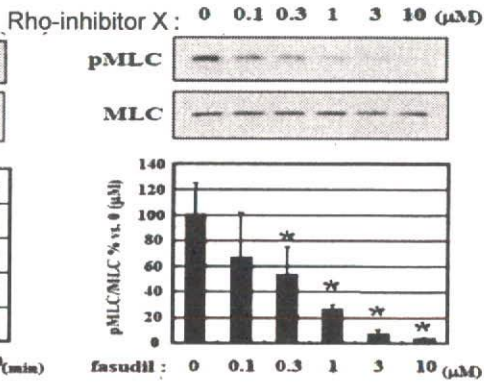
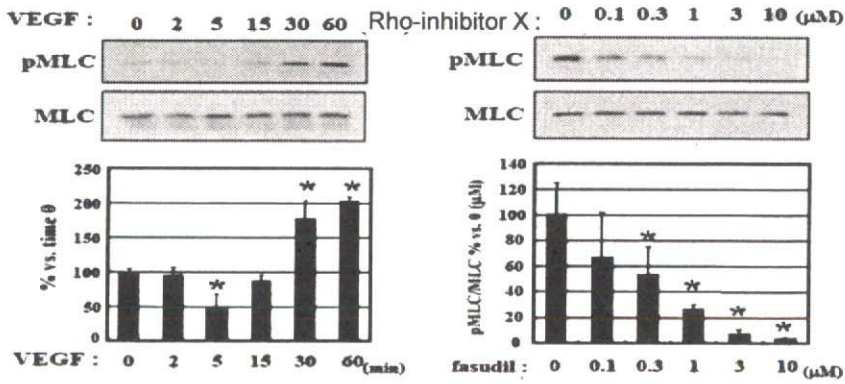
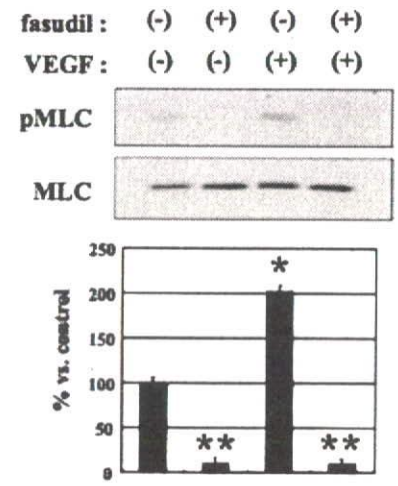
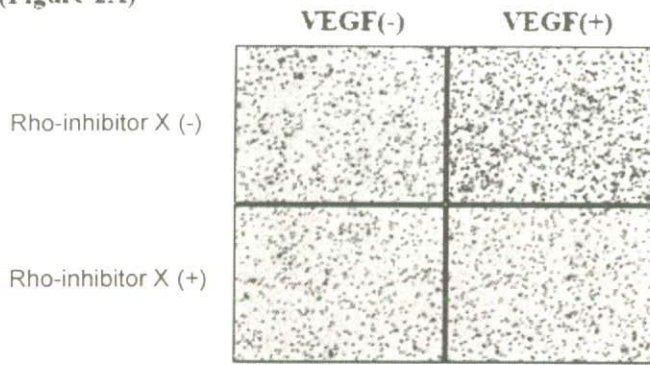


図 1: VEGF で誘導されるウシ網膜周皮細胞でのミオシン軽鎖のリン酸化と Rho 阻害剤 X の抑制作用

(Figure 2A)



(Figure 2B)

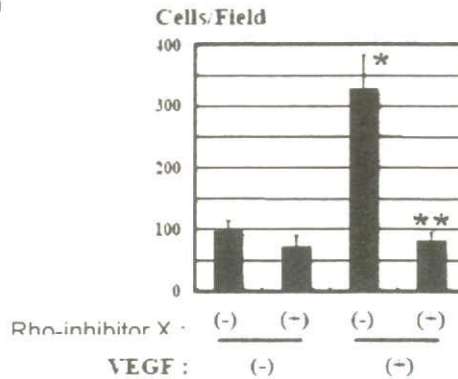


図 2: VEGF で誘導されるマウス角膜における血管新生と Rho 阻害剤 X の抑制作用

表 1、薬効試験に供した網膜黄斑変性カニクイザルの概要(左右眼の数値はドルーゼンの数)

個体 No.	No.	年齢(歳)	右眼	左眼	処置
1320307092	#1	5	5	10	Rho 阻害剤 X 非含有 PLA 徐放製剤 25mg 投与。
1310106057	#2	6	3	6	Rho 阻害剤 X 非含有 PLA 徐放製剤 25mg 投与。投与 3 ヶ月後に眼摘出し、組織染色による安全性評価。
1320108093	#3	6	5	5~10	Rho 阻害剤 X 非含有 PLA 徐放製剤 25mg 投与。投与 3 ヶ月後に眼摘出し、硝子体内濃度測定。
1219307108	#4	14	3	5	Rho 阻害剤 X 4.8% 含有徐放製剤 11.7mg 投与。投与 3 ヶ月後に眼摘出し、組織染色による安全性評価。
1229402027	#5	13	5	5	Rho 阻害剤 X 4.8% 含有徐放製剤 11.7mg 投与。投与 3 ヶ月後に眼摘出し、硝子体内濃度測定。
1319912107	#6	8	5	10	Rho 阻害剤 X 4.8% 含有徐放製剤 11.7mg 投与。
1219303032	#7	14	10	10	Rho 阻害剤 X 4.8% 含有徐放製剤 35mg 投与。投与 3 ヶ月後に眼摘出し、組織染色による安全性評価。
1219211251	#8	15	3	5	Rho 阻害剤 X 4.8% 含有徐放製剤 35mg 投与。
1319907042	#9	8	20	50	Rho 阻害剤 X 4.8% 含有徐放製剤 35mg 投与。投与 3 ヶ月後に眼摘出し、硝子体内濃度測定。

表 2; 前房水中の薬物濃度

研究事業名:政策創薬総合研究事業

研究課題名「家族性黄斑変性カニクイザルを用いた加齢黄斑変性の新規治療及び予防薬の開発」

研究目的:

加齢黄斑変性疾患(AMD)を自然発症するカニクイザルを用いて薬効評価系を確立し、国際競争力のある新規治療及び予防薬の開発を行う。アキュメンバイオフーマ株式会社からAMDの新規治療薬候補物質で、優れた抗炎症作用と抗血管新生抑制作用とを併せ持つ候補薬物の提供を受けて共同で開発を進める。九州大学大学院医学研究院眼科学分野の研究室は評価技術の提供と試験データの評価を担当する。

研究期間:

平成18年4月～平成21年3月
平成18年度、19年度予算額:各3千万円
平成20年度予算額:2千5百万円

実施体制:

主任研:寺尾恵治(基盤研・量長類センター)
分担:巖本忠尚(アキュメンバイオフーマ)
石橋達朗、畑 快右(九大院・眼科)

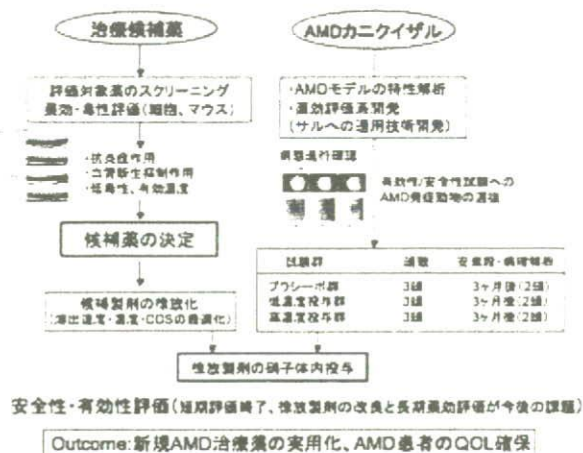
研究成果:

- ・複数の候補薬について初代培養系を用いた薬理作用のスクリーニングを実施し、抗炎症作用と血管新生抑制作用の両者を示す有望なAMD治療候補薬を選抜した。
- ・細胞株とマウスを用いて有効濃度を決定し、高濃度でも低毒性であることから臨床DDSを考慮して薬剤の徐放化を行った。
- ・AMD発症カニクイザルの硝子体に異なる濃度で徐放製剤を投与し、薬効および安全性(毒性)の評価を行った。安全性は確認されたが、徐放製剤の性能に起因する短期間(3ヶ月)の治療期間では顕著な薬効を確認するには至らなかった。

今後の計画:

網膜での抗炎症作用と血管新生抑制作用を併せ持つ新規の有望なAMD治療候補薬を見いだしたが、ヒトへの臨床適用では不可欠な徐放製剤の開発が不十分であった。優れた徐放製剤が開発できれば、唯一のモデル動物である黄斑変性カニクイザルが独占使用できる利点を生かして、国際競争力のある新規AMD治療薬の実用化を促進することが可能となる。

研究概要:



家族性黄斑変性カニクイザルを用いた加齢黄斑変性の 新規治療及び予防薬の開発

所 属 独立行政法人医薬基盤研究所
霊長類医科学研究センター
研究者 寺尾 恵治

研究要旨

遺伝的に加齢黄斑変性疾患(AMD)を自然発症するカニクイザルを用いた薬効評価系を確立し、国際的競争力のある新規治療及び予防薬候補物質の開発を行うことを目的とする。アキュメンバイオフーマ株式会社から AMD の新規治療薬候補物質として既知の「Rho-kinase 阻害剤 X」の提供を受けて、九州大学大学院医学研究院眼科学分野と共同で開発を進めた。抗炎症作用と血管新生抑制作用を併せ持つ Rho-kinase 阻害剤 X を AMD の新規治療薬として開発する目的で、初代培養系およびマウスを用いて網膜における薬理作用を確認した。DDS の最適化を目的として徐放製剤を試作し、網膜黄斑変性カニクイザルの硝子体に投与して、Rho-kinase 阻害剤 X の安全性と有効性を評価した。3ヶ月の観察期間では顕著な毒性は認められなかったが、治療効果を確認するには至らなかった。その要因として、第一世代の徐放化製剤の溶出速度が予想以上に速く、Rho-kinase 阻害剤 X の抗炎症作用、血管新生抑制作用に有効な濃度が長期間維持できなかったことがあげられる。徐放製剤の改良が急務であり、優れた徐放製剤が開発できれば、唯一のモデル動物である黄斑変性カニクイザルが独占使用できる利点を生かして、国際競争力のある新規 AMD 治療薬の実用化を促進することが可能となる。

研究分担者

- (1)アキュメンバイオフーマ 鍵本忠尚
- (2)九州大学大学院、医学研究院眼科学
石橋達朗
- (3)九州大学大学院、医学研究院眼科学
畑 快右

A. 研究目的

加齢性網膜黄斑変性症(AMD)は欧米で高齢失明の最大原因であり、日本でも緑内障、糖尿病網膜症に次ぐ中途失明の要因となっている。AMDは加齢を元に発生する後局部の網膜-色素上皮-脈絡膜複合体のさまざまな病変のことで、脈絡膜新生血管を伴う Wet 型と伴わない Dry 型に分けられる。AMD アライアンス・インターナショナルの推定では、毎年世界で 50 万人が新たに AMD との診断を受け、世界の 2500-3000 万人が AMD の疑いがある。今後、日本を含む先進国各国で高齢化が進むことは確実であり、高齢者の QOL を支える観点から AMD 治療薬の開発は急務である。医薬基盤研究所・霊長類医科学研究センターで見いだされた若年性網膜黄斑変性家系は、ヒトの加齢性網膜黄斑変性症の唯一のモデル動物であり、本研究は、AMD 疾患を自然発症するカニクイザルを用いて薬効評価系を確立し、AMD の新規治療薬として

Rho-kinase 阻害剤 X(以下 Rho 阻害剤 X)の臨床応用を目的とした有効性および安全性評価試験を実施する。

B. 研究方法

A: Rho 阻害剤 X の薬理作用確認

本研究で開発対象としている Rho 阻害剤 X の血管新生阻害作用をウシ網膜周皮細胞の初代培養系およびマウスを用い解析した。in vitro の系では初代培養したウシ網膜周皮細胞を用いて、VEGF で誘導されるミオシン軽鎖のリン酸化と細胞増殖に及ぼす Rho 阻害剤 X の阻害作用を western blotting と TdR の取り込みにより評価した。in vivo の系では、マウスを用いて VEGF で誘導される血管新生への Rho 阻害剤 X 添加の影響を調査した。

B: Rho 阻害剤 X の DDS (徐放化製剤の作成)

臨床治療における DDS の最適化を図るため、硝子体内に埋植もしくは投与する徐放化製剤の作成を試み、Rho 阻害剤 X 封入 PLA 粒子および Rho 阻害剤 X PLA 徐放製剤を試作した。

C: 徐放化 Rho 阻害剤 X のバリデーションと溶出速度

Rho 阻害剤 X の溶出速度および硝子体から前房水への移行速度を推定するため、ウサギ硝子体に異なる濃度の PLA 徐放製剤を投与し、5、10、15 日目に

安楽殺して前房水中および硝子体液中の薬物濃度を測定した。同時にウサギ硝子体液を用いたバリデーション試験を実施した。

正常カニクイザル硝子体内に異なる濃度の PLA 徐放製剤を投与し、投与後一ヶ月目に安楽殺し、硝子体中の薬物濃度を測定した。

硝子体中の薬物測定は採取した硝子体液を遠心し、上清を硝子体中に放出された薬物濃度測定に、沈殿物を硝子体内に残存した徐放製剤の薬物濃度測定に供した。

D: AMD 発症カニクイザルを用いた徐放化 Rho 阻害剤 X 硝子体投与の薬効評価

医薬基盤研究所・霊長類医科学研究センターで維持されている網膜黄斑変性家系のうち、眼底観察により発症を確認した 9 頭を 3 頭ずつ 3 群に分け、それぞれ PLA 徐放製剤の投与量を高濃度 (Rho 阻害剤 X 含量 1.68mg)、低濃度 (同 0.56mg)、非含有 (徐放化剤のみ) の条件で硝子体内に投与した (詳細表 1)。徐放製剤投与後、2 週、1 ヶ月、2 ヶ月、3 ヶ月後に前房水を採取した。投与後 3 ヶ月目に各群 2 頭を安楽殺し、硝子体液採取と組織解析をおこなった。

徐放化 Rho 阻害剤 X 投与の治療効果を評価する目的で、薬物投与前、投与後 2 週、1 ヶ月、2 ヶ月、3 ヶ月目に蛍光眼底撮影と ERG 測定を行った。

E: AMD 発症カニクイザルを用いた徐放化 Rho 阻害剤 X 硝子体投与の安全性評価

PLA 徐放製剤投与の安全性を評価するため、薬剤投与眼での炎症の有無、眼圧測定、血漿中の Rho 阻害剤 X 濃度、血液および血清生化学検査、尿検査、食餌量、体重、活動性について、毎日もしくは 2~4 週間隔で測定・観察した。組織染色により薬物を投与したサル網膜への影響を調査した。

F: 倫理面への配慮

実験動物への徐放化剤の硝子体投与手術、前房水採取、眼圧測定、ERG 測定、安楽殺などの侵襲を伴う実験処置については、眼科領域における実験指針 (ARVO) を遵守するとともに、医薬基盤研究所および九州大学の動物実験委員会による実験プロトコルの承認を前提とした。

C/D. 研究結果および考察

A: Rho 阻害剤 X の薬理作用確認

ウシ網膜周皮細胞の初代培養系に VEGF を添加して誘導されるミオシン軽鎖のリン酸化は Rho 阻害剤 X 添加により完全に阻害された (図 1)。Rho 阻害剤 X は VEGF で誘導されるマウス角膜での血管新生をほぼ完全に抑制した (図 2) ことから、同剤が網膜組織で

優れた抗炎症作用および血管新生抑制作用を示すことが確認された。(分担: 石橋、畑、鍵本)

B: Rho 阻害剤 X の製剤化 (徐放化製剤の作成)

PLA-0015 (重量平均分子量 15,000) を基材として Rho 阻害剤 X 含量が 4~5% の封入 PLA 粒子もしくは PLA 徐放製剤を作成した。(分担: 鍵本)

C: 徐放製剤の in-vivo 溶出試験 (徐放性確認)

ウサギ硝子体へ Rho 阻害剤 X 徐放製剤 (20 mg/100ml) を投与した場合の前房水中の Rho 阻害剤 X 及びその活性体 (M3) の投与後 5、10、15 日目の平均濃度は、それぞれ 0.042、0.026、0.074 mM であった。50 mg/100ml を投与した場合には、それぞれ、0.09、0.14、0.13 mM であった。一方、硝子体中の濃度は、20mg/100ml を投与した場合、それぞれ 29 (5 日)、55 (10 日)、22.5 (15 日) mM で、50mg/100ml の場合では、それぞれ 30、126、41 mM であった。

前房水中と硝子体中の濃度差が大きいことから、Rho 阻害剤 X 測定バリデーションとしてウサギ硝子体液中に溶解した阻害剤の添加回収試験を行った結果、測定法には問題ないことが判明した。この結果からサルの硝子体に 11.7mg の徐放製剤を投与すれば、硝子体中の薬物濃度が 10mM を維持できると判断した (硝子体容積: ウサギ 2ml、サル 4ml と仮定)。先行実験により Rho 阻害剤 X が眼内のサイトカイン産生やアポトーシスを抑制する最適濃度が 20mM と報告されていることから、サルへの投与実験では硝子体内での Rho 阻害剤 X 濃度を 10 mM または 30 mM で維持することとした。前述の積算法に基づき、それぞれの製剤投与量を 11.7mg および 35mg とした。

正常カニクイザルの硝子体内に 35mg の徐放化製剤を投与し、一ヶ月後の安楽殺時の硝子体中の Rho 阻害剤 X 及びその活性体濃度 (上清中) を測定したところ、1.79 および 0.93mM であった。さらに投与一ヶ月後に硝子体内に残存している製剤中の薬物濃度 (沈殿物中濃度) が 0.16 および 0.05mM となったことから、カニクイザルでは投与一ヶ月で薬物の徐放がほぼ完了することが判明した。(分担: 石橋、畑、鍵本)。

E: 徐放化 Rho 阻害剤 X 硝子体投与の薬効評価

表 1 に供試動物と投与の概略を示す。左右眼で黄斑部の変性スポット数に顕著な差のないカニクイザル 9 頭 (雄 3 頭、雌 6 頭) の右眼硝子体に Rho 阻害剤 X 4.8% 含有 PLA 徐放製剤を 11.7mg (低濃度群 3 頭) および 35mg (高濃度群 3 頭) 投与した。左眼は無処置とした。

表 2、3 に投与後の前房水中および硝子体中 (3 ヶ月のみ) の薬物濃度を示す。前房水中の Rho 阻害剤 X 及びその活性体濃度は、徐放製剤の投与量に関わらず、投与後 2 週間でピークを迎えて約 0.41mM となり、その後徐々に低下して投与 2 ヶ月以降は検出

限界以下のサンプルも見られた。硝子体中の Rho 阻害剤 X 及びその活性体濃度は投与後 3 ヶ月目に 2 頭で測定した結果、それぞれ 0.99 および 0.52mM であった。硝子体中の残存製剤濃度がそれぞれ 0.29 および 0.10mM であったことから、投与 3 ヶ月目には薬物の徐放化がほぼ完了していることが推測された。

硝子体内に投与した徐放化 Rho 阻害剤 X が血流を介して全身に流出することによる全身影響の有無を確認するため、投与後 2 週、1 ヶ月、2 ヶ月、3 ヶ月目に採取した血清について Rho 阻害剤 X およびその活性体濃度を測定したところ、いずれも検出限界 (<5ng/ml) であったことから、Rho 阻害剤 X 含有 PLA 徐放製剤の硝子体内投与では少なくとも 2 週目以降においては全身への影響は想定できないと判断した。

網膜黄斑変性発症カニクイザルへの Rho 阻害剤 X 徐放製剤投与が視覚機能、病変部形態および網膜組織に及ぼす影響を、ERG 測定、通常及び蛍光眼底撮影、摘出眼球の免疫組織学的検査により評価した。

ERG 所見: 投与前、投与後 2 週、1 ヶ月、2 ヶ月、3 ヶ月目に Rod, Flash ERG (Ops), cone, 30Hz の ERG を測定した結果、Rod b 波振幅幅、Flash a 波振幅幅、Flash b 波振幅幅の測定値で、プラシーボ投与群での測定値が徐々に低下する傾向を示すのに対し、高濃度投与群で一時期上昇する傾向が認められたが、改善傾向とは判断しがたいことから Rho 阻害剤 X 投与による機能改善を確言し得ない。なお、黄斑部の機能を詳細に解析するためには、局所 ERG 測定が有効であるが、今回使用した軽度の黄斑変性カニクイザルでは一部を除いて局所 ERG 解析が不可能であることから、今後黄斑部の機能解析に有効な方法を確立する必要がある。

蛍光眼底撮影: 投与後 1、2 ヶ月目の蛍光眼底撮影によりドルーゼン (スポット) のサイズおよび数を観察した結果、プラシーボ投与群を含めいずれもスポットのサイズおよび個数には変化が認められなかった。なお、一部の個体で投与後 2 ヶ月目に残存徐放剤に起因する硝子体白濁が認められた。

免疫組織学的解析: 投与後 3 ヶ月目に摘出した眼球を用いて網膜の TUNEL 染色を行った結果、明らかな TUNEL 陽性細胞は検出できなかった (図 3)。このことから、Rho 阻害剤 X 投与による網膜への影響は極めて少ないと判断できる。なお、ドルーゼンを含む黄斑変性部位の病理組織学的検索は現在継続中であり、最終結果をまとめて公表する予定である。(分担: 石橋、畑、鍵本、寺尾)。

F: 徐放化 Rho 阻害剤 X 硝子体投与の安全性評価

徐放化 Rho 阻害剤 X の硝子体投与の安全性に関する調査結果の一部は前項で記述した。その他の安全性評価指標について述べる。

眼圧変化: プラシーボ投与個体の眼圧をコントロールとして眼圧変化を評価した結果、Rho 阻害剤 X 含有徐放製剤を投与した群において、薬物投与による眼圧の影響は見られなかった。左眼 (薬物投与眼) と右眼 (無処置眼) の眼圧下降度を比較した結果では、Rho 阻害剤 X 含有 PLA 徐放製剤による眼圧下降効果はみられなかった。

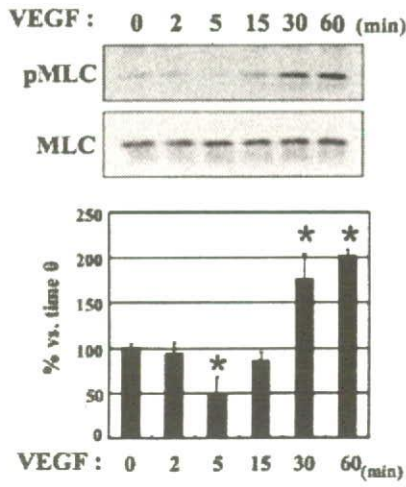
血液・血清生化学・尿検査: Rho 阻害剤 X 含有 PLA 徐放製剤を硝子体投与したサルで投与後継続的に CRP、白血球数、赤血球数、血漿板数、クレアチニン、AST、ALT、アルブミン、g-GTP、血漿タンパク、ブドウ糖、コレステロール、トリグリセリド、ビリルビン、尿素窒素、電解質 (Na、K、塩素)、尿ではウロビリノゲン、タンパク、pH、潜血、比重、ケトン体、ビリルビン、ブドウ糖を検査した結果、製剤投与に起因する検査値異常は見られなかった。さらに食餌量、飲水量、活動性にもほとんど変化が見られなかったことから、今回用いた量の Rho 阻害剤 X 含有 PLA 徐放製剤の硝子体投与では全身的な一般毒性が極めて低いと判断した。(分担: 石橋、畑、鍵本、寺尾)

E. 評価

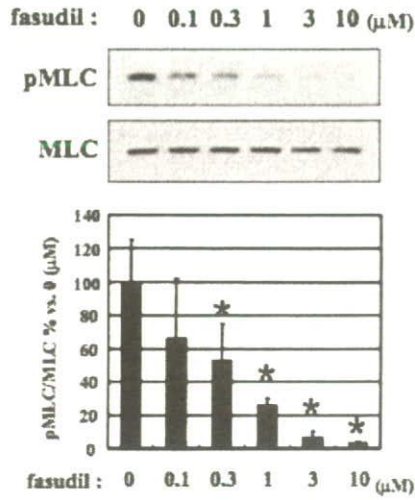
1) 達成度: AMD におけるドルーゼン形成のトリガーとなる炎症反応を抑制し、AMD の病態進行に重要な病変部での血管新生抑制という二重の薬理作用を示す Rho 阻害剤 X の実用化を目的として研究を進めた。薬理作用確認、徐放製剤作成、DDS 開発、薬効評価、安全性評価、治療プロトコルと新薬開発における非臨床試験プロセスをほぼ完結した。一方、Rho 阻害剤 X の徐放化作業に予想外の時間と経費を費やした。加えて、作成した徐放製剤の溶出速度が予想以上に速かったことから、最終的な目標としていたモデルザルを用いた薬効評価実験を短期間 (3 ヶ月) で終了せざるを得ない状況となった。長期的発症プロセスをたどる AMD への治療効果を 3 ヶ月で評価するのは不可能であったが、今回試みた治療プロトコル (Rho 阻害剤 X 含有 PLA 徐放製剤の硝子体内投与) では少なくとも 2 週目以降においては全身への影響は無いことが判明した。

2) 研究の意義と今後の展望: AMD の進行要因に関わる Rho 阻害剤 X の有効性は実証できたことから、今後長期間徐放が持続する製剤が開発できれば、唯一のモデル動物である黄斑変性カニクイザルを維持している利点を生かして、国際競争力のある新規医薬品の実用化を促進することが可能となる。

(Figure 1A)



(Figure 1B)



(Figure 1C)

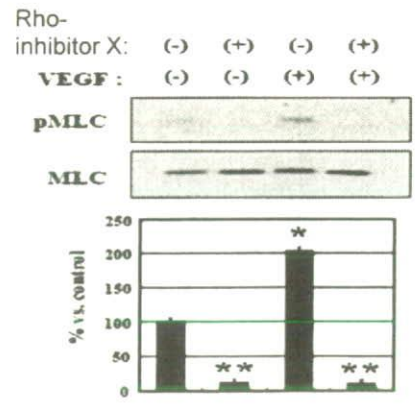
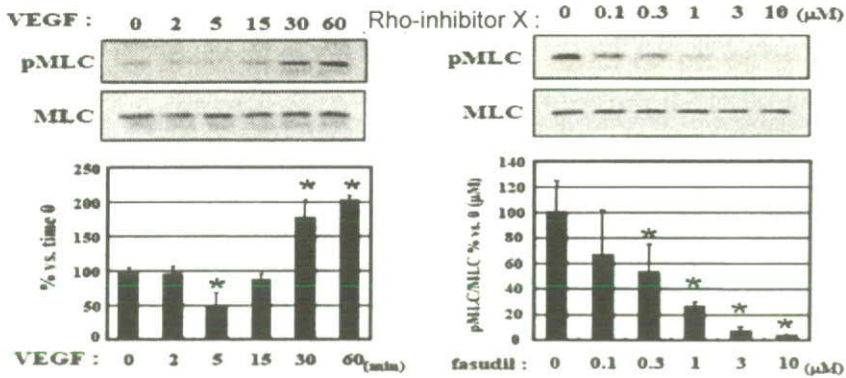
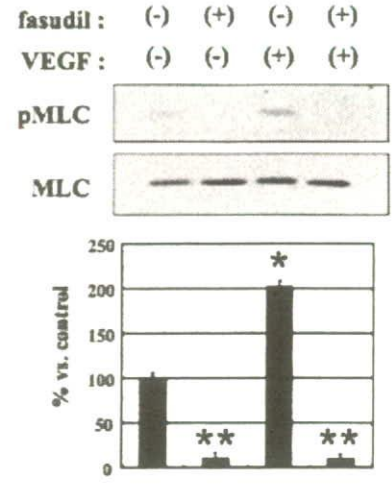
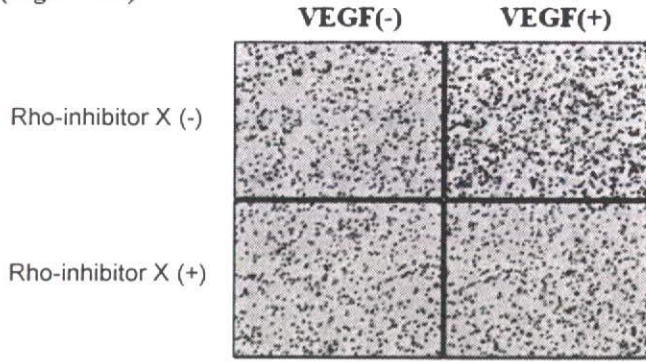


図 1: VEGF で誘導されるウシ網膜周皮細胞でのミオシン軽鎖のリン酸化と Rho 阻害剤 X の抑制作用

(Figure 2A)



(Figure 2B)

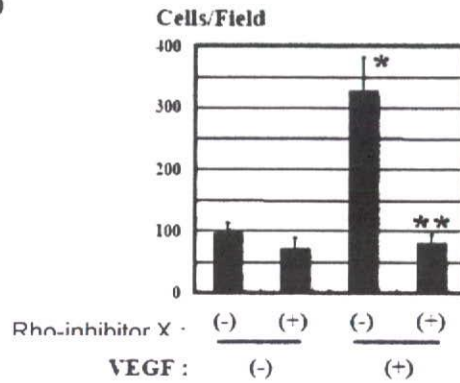


図 2: VEGF で誘導されるマウス角膜における血管新生と Rho 阻害剤 X の抑制作用

表 1、薬効試験に供した網膜黄斑変性カニクイザルの概要(左右眼の数値はドルーゼンの数)

個体 No.	No.	年齢(歳)	右眼	左眼	処置
1320307092	#1	5	5	10	Rho 阻害剤 X 非含有 PLA 徐放製剤 25mg 投与。
1310106057	#2	6	3	6	Rho 阻害剤 X 非含有 PLA 徐放製剤 25mg 投与。投与 3 ヶ月後に眼摘出し、組織染色による安全性評価。
1320108093	#3	6	5	5~10	Rho 阻害剤 X 非含有 PLA 徐放製剤 25mg 投与。投与 3 ヶ月後に眼摘出し、硝子体内濃度測定。
1219307108	#4	14	3	5	Rho 阻害剤 X 4.8% 含有徐放製剤 11.7mg 投与。投与 3 ヶ月後に眼摘出し、組織染色による安全性評価。
1229402027	#5	13	5	5	Rho 阻害剤 X 4.8% 含有徐放製剤 11.7mg 投与。投与 3 ヶ月後に眼摘出し、硝子体内濃度測定。
1319912107	#6	8	5	10	Rho 阻害剤 X 4.8% 含有徐放製剤 11.7mg 投与。
1219303032	#7	14	10	10	Rho 阻害剤 X 4.8% 含有徐放製剤 35mg 投与。投与 3 ヶ月後に眼摘出し、組織染色による安全性評価。
1219211251	#8	15	3	5	Rho 阻害剤 X 4.8% 含有徐放製剤 35mg 投与。
1319907042	#9	8	20	50	Rho 阻害剤 X 4.8% 含有徐放製剤 35mg 投与。投与 3 ヶ月後に眼摘出し、硝子体内濃度測定。

表 2; 前房水中の薬物濃度

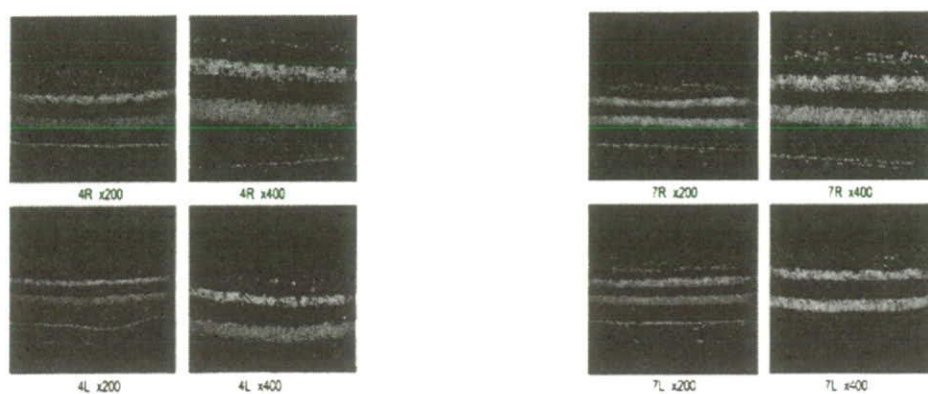
Animal No.	Rho 阻害剤 X 及びその活性体濃度(mM)			
	投与後 2 週間	投与後 1 ヶ月	投与後 2 ヶ月	投与後 3 ヶ月
#1	ND	ND	ND	ND
#2	ND	ND	ND	ND
#3	ND	ND	ND	ND
#4	0.46	0.28	0.05	0.04
#5	0.35	0.21	0.05	0.04
#6	0.36	0.24	ND	ND
#7	0.24	0.15	0.03	0.02
#8	0.69	0.21	ND	ND
#9	0.37	0.16	0.03	0.02

ND:検出限界(5ng/ml)以下

表 3:硝子体中の薬物濃度(投与後 3 ヶ月)

Animal No.	Rho 阻害剤 X 及びその活性体濃度(mM)
#3 R	ND
#3 L	ND
#5 R	0.99
#5 L	ND
#9 R	0.52
#9 L	ND

ND:検出限界(5ng/ml)以下



Rho 阻害剤 X4.8%含有
徐放剤 11.7mg 投与群(#004)

Rho 阻害剤 X4.8%含有
徐放剤 35mg 投与群(#007)

図 3:Rho 阻害剤 X4.8%含有徐放剤を硝子体内投与後 3 ヶ月目の網膜の免疫組織解析

R:右眼(薬剤投与眼)
L:左眼(薬剤非投与眼)

Red:核染色
Green:TUNEL 染色

ワクチン創生の新テクノロジーによる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 地球温暖化で我国再燃が危惧される日本脳炎ウイルス (JEV)、及び我国侵襲可能性の高いウエストナイルウイルス (WNV) は、共に蚊が媒介する同一血清型群の極めて近縁なウイルスである。そこで、既に小島ら・小西らがそれぞれ開発してきた「表面はウイルスと同等で内部にウイルスゲノムを含まない非感染性のウイルス様粒子 (VLP)/細胞外粒子 (EP)」発現技術を用い、感染ウイルス大量培養もそのための対応施設も不要な、それ故安全/安価な理想の次世代 JEV、WNV ワクチンについて医薬品製造国際基準適合 VLP/EP ワクチンの研究開発を推進した。

まず、ヒト用医薬品製造に承認されている CHO 細胞を親株に用いて、

- (1) JE-VLP を持続的に大量産生する安定な CHO-JE 細胞株を無血清培地/無蛋白培地に馴化させた細胞株の樹立を完了した。これら細胞株が産生する JE-VLP 抗原の性状を解析し、ワクチンへの有用性を示唆した。
- (2) 既に樹立が完了していた持続発現 CHO-WN 細胞株から粗精製した WN-VLP のマウス免疫実験を行い、WN-VLP は高い中和抗体価を誘導すること、免疫マウスは大量 (250 LD₅₀) の WNV 感染に対しても 100%生存することを示した。

また、米国 FDA がヒト用ワクチン製造用に認めた expresSF+昆虫由来細胞を親株に用いて、

- (3) JE-EP を持続的に大量産生する安定な expresSF+細胞株の樹立に成功した。産生 JE-EP 抗原は感染 C6/36 蚊細胞由来の JEV と糖付加等同等の性状を示すことから、JE-EP ワクチン製造の有力な細胞株になる事を示唆した。

分担研究者

- (1) 国立感染症研究所・感染病理部 高橋 秀宗
田中 道子
- (2) 神戸大学・医学部 小西 英二
- (3) (財) 阪大微生物病研究会 東 雅

A. 研究目的

我国はフラビウイルス流行圏外であるが、温暖化でこの脅威に再度曝される危険が増している。

疫学研究では、日本脳炎ウイルス (JEV) が流行地より頻繁に飛来し、国内で越冬することが示されている。東アジアの JE 制圧に貢献してきた世界で唯一認可された我国発マウス脳由来不活化ワクチンは積極的接種勧奨が差控えられ、基礎免疫の無い小児世代が拡大し、幼児患者が近年発生した。細胞培養不活化新ワクチンの認可で再流行阻止に展望が開けた現在、感染性 JEV 大量培養工程/バイオリスク対応製造設備が不要で安全/安価な次世代ワクチン開発の好機である。

一方、ウエストナイルウイルス (WNV) は 1999 年突如米国に侵入し、短期間で全土に定着し、北米

大陸・カリブ海全域に拡大し、未だに流行が続いている。我国では、2005 年に米国渡航者の初症例が報告され、ウラジオストックの野鳥から WNV の分離報告を考慮すると、強い警戒が必要である。フラビウイルスはワクチンで予防可能であるが、ヒト用 WN ワクチンは未だ無い。

着目すべきは、JEV、WNV とも蚊が媒介する同一血清型群の極近縁ウイルスという点である。小西ら、小島らのグループはそれぞれ、表面はウイルス粒子と同等で内部にウイルスゲノムを持たない非感染性粒子 (ウイルス様粒子=VLP: virus-like particle 或いは、細胞外粒子=EP: extracellular particle) 発現技術開発に成功し、製造工程も安全/特別な封じ込め施設不要で安価な理想の VLP/EP ワクチン開発に路を拓いてきた。

しかし、本課題の目指す次世代新ワクチン開発では、prM-E 遺伝子を恒常的に発現し、E 蛋白 prM/M 蛋白からなる VLP/EP を大量産生する、安定な持続培養細胞株を樹立することを基本戦略としている。従って、細胞培養によるバイオ医薬品製造国際基準に合致する必要がある。そこで、ウイルス生活

環での中間宿主(哺乳類)・吸血蚊(昆虫類)を考慮し、(1)、(2)小島/東らは哺乳動物、(3)小西らは昆虫細胞株の中から国際認可適合細胞株を選択した。これらの細胞を元株にして、我々の新技術でバイオ医薬品国際基準に合致する持続産生細胞を樹立し、安全/安価な JE-VLP, WN-VLP ワクチンを開発することを本研究の目的とした。

B. 研究方法

(1) VLP 形成技術による JE ワクチンの開発

JE-VLP 持続発現細胞株の培養: ATCC より購入した CHO-K1 (CCL-61) 細胞に JEV prM-E cDNA 発現ベクター-J12 を導入して JE-VLP を持続発現させた接着性細胞株 CHO-J12 は、昨年度樹立したクローン化細胞を用いた。また、培養用 FBS も nested RT-PCR 法で BVDV (牛ウイルス性下痢症ウイルス) RNA ゲノム陰性を確認した昨年度と同一ロットを用いた。無血清培地/無蛋白培地馴化細胞株の樹立: CHO-J12 細胞の 10% FBS を含む培地を、半量づつ無血清培地或いは無蛋白培地で置換して FBS 濃度を 1/2 づつ順次低下させ、継代を行った。FBS フリー培地において 5 継代連続して細胞増殖が維持された時点で馴化株とした。JEV 抗原発現の検討: JEV 抗原発現は、JEV-E 特異的中和単クローン抗体 503 を用いた間接蛍光抗体法 (IFA) で検討した。抗原発現の継代安定性・持続性は、継代時の培養上清を 503 抗体のサンドウィッチ ELISA (阪大微研会) で判定した。発現 JEV 抗原の性状解析: 培養上清、超遠心上清および沈降画分の JEV-E 抗原量は、精製不活化 JEV (阪大微研会) を標準抗原とする 503-ELISA で測定した。樹立細胞株の培養上清から、限外膜濃縮又はポリエチレングリコール沈殿、Sephacryl S-300 ゲル濾過又は蔗糖密度勾配遠心法で粗精製した JEV 抗原を、JEV 特異抗体、フラビウイルス交叉性抗体、ポリクローナル抗体等を用いた ELISA・ウエスタンブロット法等により、中和エピトープの有無・構成蛋白の性状を解析した。抗原形態は、蔗糖密度勾配遠心のピーク画分を濃縮後ネガティブ染色し、電子顕微鏡で観察した。

(2) VLP 形成技術による WN ワクチンの開発

WN-VLP 持続発現細胞株: ATCC の CHO-K1 (CCL-61) 細胞に WNV prM-E cDNA 発現ベクター-WN12 を導入して WN-VLP を持続発現する CHO-WN12 接着性細胞株は、既に樹立したクローン化 CHO-WN12.6 細胞及びこの再クローン化 CHO-WN12.6.6 細胞を 10% FBS を含む F12-K 培地 (Gibco) で継代して用いた。また、これらの接着性細胞株を CHO-S-SFM II 無血清培地 (Gibco) に馴化した浮遊性細胞は、CHO-WN12.6 S

細胞及び CHO-WN12.6.6 S 細胞を用いた。接着性持続発現細胞の WN-VLP 産生条件の検討: 接着性 CHO-WN12.6.6 細胞 (5×10^4 cells/ml) を 10% 或いは 8% FBS を含む選択薬剤 ($10 \mu\text{g/ml}$) 添加 F12 培地で播種し、培養 5 日間の細胞増殖を調査した。WN-VLP 産生条件の検討には 225 cm^2 T-フラスコで培養し、4 日目に 8% FBS-F12、4% FBS-F12、又は CHO-S-SFM II 培地で培地交換を行った。その後 5 日間培地中の WN-VLP 量を我々の確立した WNY-11 単クローン抗体のサンドウィッチ ELISA で、精製不活化 WNV ($100 \text{ ELISA 単位: 蛋白質含量 } 15 \mu\text{g/ml}$) を標準抗原に用いて測定した。100 のパイロット WN-VLP 産生培養: CHO-WN12.6.6 細胞を 8% FBS-F12 培地で培養面積 6320 cm^2 の多層培養を行った。4 日目に 4% FBS 培地に交換し、以降 3 日或いは 4 日間隔で培地交換を 4 回行い、計 ~ 100 の培養上清を得た。低速遠心処理後、限外膜濃縮による濃縮、ショ糖密度勾配遠心 2 回、透析及び膜ろ過で精製した。精製 WN-VLP 約 300 ml を 2 分し、一方にはホルムアルデヒド量で $100 \mu\text{g/ml}$ を添加し 4°C で静置後、電子顕微鏡観察等で性状解析を行った。WNV 抗原の性状解析: WNV 抗原発現は、WNV-E 特異的中和単クローン抗体 WNY-11 を用いた IFA で、抗原量は精製不活化 WNV ($100 \text{ ELISA 単位: 蛋白質含量 } 102 \mu\text{g/ml}$) を標準抗原とする WNY-11 抗体のサンドウィッチ ELISA (阪大微研会) で検討した。抗原蛋白は WNV E 及び M 蛋白特異抗体、フラビウイルス交叉性ポリクローナル抗体等を用いたウエスタンブロット法で解析した。蛋白量測定には市販の Lowry 法による定量キットを用いた。抗原形態は、濃縮試料をネガティブ染色し電子顕微鏡で観察した。WN-VLP 抗原精製法の検討: 樹立細胞株培養上清中の WNV 抗原を限外膜濾過法又はポリエチレングリコール沈殿法で濃縮し精製用材料とした。VLP 精製法の検討は、排除限界分子量の異なるゲル濾過担体のカラムクロマト法、蔗糖密度 (w/w) 勾配遠心法、陽イオン交換/陰イオン交換/疎水性結合/担体のアフィニティーカラムクロマト法を種々組み合わせで行い、単位蛋白当りの WNV E 抗原価を指標に精製度を評価した。マウス免疫実験及び感染防御実験: ホルマリン処理あるいは無処理の粗精製 WN-VLP を、4 週齢の雌 C3H/HeN または ddY マウスの腹腔内あるいは皮下に 1 週間間隔で 2 回投与した。2 回目免疫の 1 週間後に麻酔条件下で全採血し、血清分離後非動化した。この血清の段階希釈系列を調整し、WNV-NY99 株の Vero 細胞を用いたブランク法で中和抗体価 (PRNT_{50}) を測定した。感染防御試験では、免疫実験と同様に VLP 抗原を投与したマウスの 6 週齢時 (2 回目投与の 1 週間

後)に1,000 pfuのWNV-NY99株を腹腔内に接種した。接種後14日間臨床症状を観察し、マウスの生存率でVLP抗原の感染防御効果を判定した(30%の体重減少は死亡と判定し安楽死の処置を行った)。

(3) 昆虫細胞を用いて生産した次世代JEワクチンの基礎的評価：ヒト用ワクチン製造に適した細胞株で産生したウイルス抗原の解析

細胞：昆虫細胞として、expresSF+細胞(Protein Sciences社)を用いた。この細胞は、カイコ(*Spodoptera flugiperda*)由来のSf9細胞から得られたクローンであり、ヒト用ワクチン製造に使用可能にするために米国FDAが開発に関与した。用いた培養液は、EX-CELL420(SAFC Biosciences社)、BacVector(Novagen社)、KBM(Kohjin Bio社)、SF900III(Invitrogen社)。対照としてSf9細胞(Novagen社)を、BacVector培養液を用いて28℃で培養した。哺乳類細胞として、CHO細胞を、10%FBS添加イーグルMEM培地を用いて37℃で培養した。JEVのprM/E遺伝子を安定的に発現するCHO細胞として、すでに構築したF細胞(Konishi et al., *Journal of Virology* 75, 2204-12, 2001)を用いた。**ウイルス：**JEV中山株を感染させたC6/36細胞培養液を、生化学的解析また中和試験の抗原として用いた。**プラスミド：**expresSF+細胞における発現に使用したプラスミドは、昨年度Sf9細胞の一時発現系に使用したものとベクター部分は同じである。ただし、prMの開裂に伴うEの配置転換による融合活性の獲得が安定発現細胞株の樹立に障害をもたらすため、細胞内酵素フリンによるprM上の切断部分に存在するアミノ酸モチーフRSRRをTSRRに改変し、開裂を抑制するようにした。すなわち、昆虫細胞用発現プラスミドpIB/V5-Hisベクター(Invitrogen社)に、すでに作製したpcJEEP(Konishi et al., *Journal of Virology* 75, 2204-12, 2001)に含まれる目的の遺伝子(prM内に上記変異を付加したJEV中山株のprM/E遺伝子)を組み込んで作製したものである(これをpIBJEEPと称する)。pIB/V5-Hisベクターは、昆虫細胞で外来遺伝子が発現できるようにOpIE2プロモーターとOpIE2ポリA配列を搭載したベクターである。一方、CHO細胞におけるJEV蛋白発現に使用したプラスミドは、pcDNA3ベクター(Invitrogen社)にJEV中山株のprM/E遺伝子を組み込んだpcJEME(Konishi et al., *Journal of Virology* 72, 4925-30, 1998)である。導入試薬として、FuGENE(Roche社)、またはリポフェクチン(Invitrogen社)を用いた。また、選択薬剤として、プラスチシジン(Invitrogen社)を用い

た。**免疫染色：**アセトン・メタノール(1:1)で固定した細胞を、JEVのEに対するモノクローナル抗体(JE-10B4)あるいはprM/Mに対するモノクローナル抗体(J2-2F1)で反応後、ABC試薬(Vector社)により染色した。**密度勾配遠心：**10-40%の蔗糖密度勾配液上に重層して超遠心後、20分画を得た。**EP及びウイルス粒子の精製：**JEV抗原発現細胞あるいはJEV感染細胞の培養液を、ポリエチレングリコール(PEG)沈殿法及び蔗糖密度勾配遠心法で精製して得た。すなわち、培養液に10%PEG、1.9%NaClを添加し、4℃で2時間保温して沈澱させた。この沈澱をTN緩衝液(10mM Tris-HCl [pH 7.5]、100mM NaCl)に溶解し、10-40%ショ糖密度勾配により分画した。**抗原量測定のサンドイッチELISA：**JEVに対するウサギポリクローナル血清を感作したマイクロプレートに、抗原検体、JE-10B4抗体、アルカリフォスファターゼ標識抗マウスIgG、パラニトロフェニルリン酸を順に反応させた。E抗原スタンダードから、未知資料の抗原量を計算した。E抗原スタンダードの蛋白量は、ウシ血清アルブミン(BSA)を標準蛋白として、電気泳動後の銀染色によりE蛋白バンドの色調と比較することにより求めた。**蛋白量の測定：**Quick Start Bradford Dye Reagent(BioRad社)を用い、BSAを標準蛋白として595nmにおける吸光度から資料の蛋白量を算出した。**感染力価の測定：**Vero細胞を用いたブランク法によりウイルス感染力価(PFU)を求めた。

ウエスタンブロット：prM/E遺伝子を導入した細胞、あるいは感染細胞の培養液から、ポリエチレングリコール沈殿法及び蔗糖密度勾配遠心により精製したウイルス蛋白をSDS-ポリアクリルアミド電気泳動の後、ポリビニリデンジフルオリド膜に転写した。転写された蛋白をJE-10B4抗体及びJ2-2F1抗体で染色した。**PNGaseF処理：**精製ウイルス蛋白を、N-グリコシダーゼF(PNGaseF; Roche社)により37℃で24時間処理した。

(倫理面への配慮)

マウスを用いた動物実験は、「研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針」(文部科学省告示第71号、平成18年6月1日)に基づき、実験実施機関において動物愛護倫理規程に則り申請・承認を受けた方法で実施した。

C. 研究結果

(1) VLP形成技術によるJEワクチンの開発

無血清培地/無蛋白培地への馴化 CHO-J12細胞株の樹立：CHO-J12細胞の10%FBSを含むF12-K培地(Gibco)を、無血清培地(CHO-S-SFMII;Gibco)

又は無蛋白培地 (CD OptiCHO; Gibco) で半量づつ置換して継代し、最終的に FBS を含まない培地へ馴化させた。その結果、馴化開始後 129 日目に CHO-J12 SF 細胞株を、168 日目に CHO-J12 Opti 細胞株を得た。この馴化過程で接着性であった CHO-J12 細胞は浮遊性細胞に転換された。CHO-J12 SF 細胞の増殖速度は CHO-J12 親細胞とほぼ同等であったが、CHO-J12 Opti 細胞の増殖速度は約 1/2 に低下した。しかし、両浮遊細胞株とも細胞濃度が 2 倍以上にまで増殖可能であった。

浮遊型細胞株の JEV 抗原発現：JEV 抗原発現量を馴化中に測定したところ、CHO-J12 SF 及び CHO-J12 Opti 細胞とも FBS 濃度を半減した時点で細胞増殖速度が低下し発現量も低下したが、維持継代で回復する傾向が認められた。馴化完了後 16 継代時の CHO-J12 SF 細胞及び 5 継代時の CHO-J12 Opti 細胞と CHO-J12 親株との比較では、ほぼ同等の JEV 抗原発現があり、ELISA で 20~40 μ g/ml 蛋白相当 (標準不活化 JEV=100 単位；蛋白含量 9.1 μ g/ml、阪大微研会) が維持されていた。

接着性 CHO-J12 細胞株の JE-VLP：昨年度樹立した CHO-J12 細胞の発現安定性を調査した。5 継代ごとに 20 継代まで培養上清中の JEV 抗原量を測定したところ、継代の影響は全く認められず、一定値 (27.4~27.9 μ g/ml) の JEV 抗原を培地中に放出していた。また、継代 21 代においても抗原陽性細胞は 100%であることが IFA で確認された。これに対して、抗原陰性細胞が混在しているクローン化前の CHO-J12 細胞は継代により抗原発現量が速やかに低下し、5 継代で 1 μ g/ml 以下に、10 継代以降は検出限界以下になり、ほぼ抗原陰性細胞に置き換わっていた。

CHO-J12 細胞の VLP を培地から精製・解析するため至適培養条件を、播種細胞数、添加 FBS 濃度、産生基本培地、培養日数、選択薬剤添加の有無について検討した。その結果、1:2.5 スプリット・薬剤無添加の 0.4% FBS-SFM II (又は F12-K) 培地・3 日間培養で、細胞形態が変化し浮遊細胞化が進行するものの、産生量に影響しないことが判明した。

そこで、この条件で 250 ml 培養を行い、限外膜濃縮後ゲルろ過で部分精製を行った。排除限界画分に分画された JEV 抗原は、JEV E 蛋白と prM 蛋白を保持していることがウエスタンブロット法で、Rate Zonal 蔗糖密度勾配遠心法では緩やかなピークとして分画されることが示された。また、電子顕微鏡観察を行ったところ、直径約 30 nm の球形粒子構造と共に、10~20 nm の不定形構造が多数観察された。

CHO-J12 の接着性細胞と浮遊型細胞由来 JE-VLP

の比較：CHO-J12、CHO-J12 SF、CHO-J12 Opti 各細胞培養上清中の JEV 抗原について、フラビウウイルスの SHA 粒子沈降超遠心条件 (160,000 \times g、2~16 hr) での挙動を検索した。その結果、何れの培養上清とも 16 時間超遠心により JEV 抗原は全て沈降し、上清には抗原が検出されなくなった。しかし、2 時間の遠心では抗原の約 50%しか沈降せず、残りの 50%は上清中に残存した。この上清を再度 16 時間遠心すると抗原は全て沈降画分に移行した。これら 2 時間の超遠心で沈降する抗原と沈降しない抗原をウエスタンブロットで解析すると、何れも JEV E 蛋白と prM 蛋白を含んでおり、構成蛋白上の違いは見出されなかった。しかも、接着性 CHO-J12 細胞と、浮遊型の CHO-J12 SF 細胞及び CHO-J12 Opti 細胞の間に抗原構成蛋白の違いは認められなかった。

現在、マウス免疫実験で粗精製 JE-VLP 抗原の中和抗体誘導能について検討を行っている。

(2) VLP 形成技術による WN ワクチンの開発

接着性及び浮遊型 CHO-WN12 細胞株由来 WNV 抗原の比較：10% FBS 添加培地で継代される接着性 CHO-WN12.6 及び CHO-WN12.6.6 細胞と、これらは無血清培地に馴化させた浮遊型 CHO-WN12.6 S 及び CHO-WN12.6.6 S 細胞が産生する培地中の WNV 抗原をウエスタンブロット法で解析した。その結果、細胞特性が接着性か浮遊性かを問わず何れの細胞も、感染 Vero 細胞由来の WNV と同一のプロセシングされた成熟 E 蛋白及び M 蛋白から成る抗原を産生していた。また、平衡蔗糖密度勾配遠心法で単一ピークとして分画され、WNV 中和単クローン抗体ともフラビウイルス交叉性単クローン抗体とも反応し、電子顕微鏡観察では直径約 30 nm の球形粒子構造が確認された。

接着性持続発現細胞の WN-VLP 産生培養条件の検討：CHO-WN12.6.6 細胞の培養条件を検討した結果、10%あるいは 8% FBS を含む F12 培地での細胞増殖は同等で、培養 5 日間で細胞数は約 10 倍に達した。次に、フルシートまで増殖した細胞からの WN-VLP 産生条件を検討した。その結果、4% FBS 添加培地では培地交換 3 日目に ELISA 抗原価はピークとなり、8% FBS 含有培地でも 3 日目以降プラトーに達した。FBS 濃度を低下させると抗原産生量は低下し、無血清培地では培養日数を重ねても産生量は増加しなかった。

10 ℓ のパイロット産生培養による WN-VLP：産生培養条件検討結果を踏まえて、CHO-WN12.6.6 細胞を多層培養器で培養し、培地交換 4 回で回収された培養上清約 10 ℓ から WN-VLP の精製を行った。

精製 WN-VLP 抗原約 300ml の ELISA 価は 98.1、蛋白質含量は 37.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ であった。従って、培養上清約 10 l からの抗原収量は約 11mg であった。この精製 WN-VLP の電子顕微鏡観察を行ったところ、WN-VLP と推測される直径 30~40 nm の粒子と 10~20 nm の不定形構造が観察された。また、ホルマリン処理による WN-VLP の形態変化は認められなかった。

WN-VLP 抗原精製法の検討：電子顕微鏡観察で直径約 30 nm の球形粒子構造と共に、10~20 nm の不定形構造が大量に認められたことから、VLP 抗原精製法を検討した。

まず、HIV ビリオン等巨大分子量構造物の分画報告例がある Sephacryl ゲル濾過法を試みた。排除限界分子量の異なる S-1000, S-500, S-400, S-300 を比較した結果、S-300 が可溶性蛋白と VLP 間の最も高い分離能を示した。次に、S-300 による粗精製 VLP を 45% 蔗糖クッション遠心法、20-60% 不連続蔗糖密度遠心法、或いは 10-45% 蔗糖平衡密度勾配遠心法で分画し電子顕微鏡で観察したところ、球形粒子が著しく減少し、不定形構造が顕著に増加した。原因解明のため S-300 粗精製 VLP を 4°C で 15% と 30% 蔗糖中に保管すると、30% 蔗糖中の VLP は粒子構造が崩壊し不定形構造に変化することが判明した。

他方、VLP 表面の電荷、親水性/疎水性等化学的性質によるアフィニティークロマトグラフィーも種々のカラムを用いて検討した。しかし、市販の陽イオン交換担体、陰イオン交換担体、疎水性結合担体何れを用いた場合にも満足できる結果は得られなかった。唯一、不活化 JEV 或いはインフルエンザウイルス精製例のある Sellufine sulfate カラムを用いると、比較的緩和な pH と NaCl 濃度の組合せ溶出条件で VLP 抗原の分画が可能であった。現在、Sellufine 分画 VLP の単位蛋白当たり中和 WNY-11 抗原価について調査中である。

CHO-WN12 由来 VLP 抗原の免疫原性・感染防御効果：VLP 精製プロトコルは現在未完成ではあるが、粗精製 VLP がどの程度の中和抗体誘導能を保持し、致死量以上の WNV 感染に対して有効な防御効果を誘導できるか否か、マウス免疫実験・WNV チャレンジ実験で予試験的ながら検討を加えた。

まず、10 l のパイロット培養から精製された WN-VLP (10 μg 及び 5 μg) の ddY マウス免疫実験では以下の結果が得られた。即ち、皮下/腹腔の投与経路の違い、あるいは WN-VLP 抗原のホルマリン処理の有無による中和抗体の誘導には差が認められなかった。WN-VLP 免疫群では何れの免疫条件においても、1 群 5 匹の平均中和抗体価は 100 倍以

上であった。

次に、純系 C3H/HeN マウス腹腔に蛋白量で 2 μg ELISA 当量の粗精製 VLP を免疫し、血清中の中和抗体価を測定したところ、PRNT₅₀ が 1:320 の高レベルであった。しかし、当量の不活化 WNV ワクチン試作品 (阪大微研会) の免疫で誘導された中和抗体価の 1:1,280 には及ばなかった。

免疫実験と同様のスケジュールで WN-VLP を投与した C3H/HeN マウスの腹腔内に、1,000 pfu (約 250 LD₅₀) の WNV NY-99 株を攻撃接種した。結果は、非免疫群 (PBS 投与群) マウスが 10 日以内に全匹死亡したのに対して、VLP 免疫群は何ら臨床症状を呈することも無く、全匹生存した。勿論、不活化 WNV ワクチン試作品免疫群も 100% の生存率であった。

(3) 昆虫細胞を用いて生産した次世代 JE ワクチンの基礎的評価：ヒト用ワクチン製造に適した細胞株で産生したウイルス抗原の解析

ELISA により測定される現行ワクチンの E 抗原量：E 抗原の定量法は発現量を比較する上に重要である。我々の教室では、最も一般的に用いられるサンドイッチ ELISA 法を用いている。この方法で得られる E 抗原量は、スタンダードに用いる E 蛋白に大きく左右される。我々は、スタンダードの E 抗原を BSA の階段希釈液とともに電気泳動で分画し、銀染色による E 蛋白バンドの色調を BSA のそれと比較することにより E の蛋白量を求めた。

この E 蛋白を標準抗原として、市販ワクチンの E 抗原量を測定すると、総蛋白量の約 10 分の 1 であった。ワクチンは精製ウイルス粒子であるために E 抗原は多く含まれると考えられるが、おそらくホルマリン不活化の過程で抗原性が失われているものと思われる。したがって、我々の ELISA 系で測定される E 抗原量は、ワクチン当量で表せば約 10 倍となる。

expresSF+細胞の性状：expresSF は Sf9 由来であるため同様の性状をもつと思われるが、クローン化により特殊な性状を示すことがあるため、各種の昆虫用培養液における細胞増殖速度を両細胞株で比較した。その結果、KBM を用いたときの Sf9 細胞の増殖は速かったが、それ以外は両細胞株で差は認められなかった。また、expresSF+細胞においては、どの培養液においても、継代後の増殖倍数は同等であった。

トランスフェクションの条件：pIBJEEP が効果的に expresSF+細胞に導入できる条件を検討した。まず、FuGENE 試薬を用いて、各種の昆虫培養液における E 抗原産生量を比較した。その結果、BacVector

において最も高い産生量が得られたため、以下の実験ではBacVectorを用いた。

次に、導入試薬としてFuGENEまたはLipofectinを用い、1-3 μg のプラスミドを導入し、24時間後に培養上清中のE抗原量をELISAで、また抗原発現細胞率を免疫染色により測定した。その結果、上清中に放出されたE抗原量は、FuGENE試薬ではLipofectin試薬よりも3~13倍高い値であった。抗原発現細胞率に大きな差が見られないことから、FuGENE試薬では、1細胞当たりの抗原産生量が高いことが推測される。以降はFuGENE試薬を用いて行った。

さらに、導入するプラスミドと試薬の混合比率について検討した。高い産生量が得られた2または3 μg のプラスミドを、FuGENE試薬と1:2、1:3または1:4の比率で混合し、導入した。導入24時間後の培養上清中のE抗原量を測定した結果、ほとんど差が見られなかったが、プラスミド3 μg 、FuGENEとの混合比率1:3の条件で今後の実験を行うこととした。

選択薬剤の濃度：pIBJEEPが導入されたexpresSF+細胞を効果的に選択する薬剤の濃度を検討した。プラスミド導入24時間後に5-20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のプラスチシジンを追加し、10日間培養した後、継代を行った。さらに5日後に継代を行い、各時点での培養上清中のE抗原量を比較した。その結果、5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ では低い値であったが、10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ と20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ では差が見られず、選択には10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上の濃度が必要であることが示された。

細胞の発現安定性：薬剤により選択されたexpresSF+細胞が、安定的にE抗原を発現し続けるかを23継代まで調べた。薬剤非添加でもE抗原は検出されたが、その量は極めて低かった。10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のプラスチシジン添加により、0.5~1.6 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 前後のE抗原が安定して得られた。さらに、培養液中のE抗原は4℃および28℃において、1ヶ月以上安定であった。

また、安定発現するexpresSF+細胞を免疫染色した結果、E及びprM/M抗原の細胞内発現が示された。染色が肉眼で検知された細胞の割合は約30%であった。プラスミドにはprM/E遺伝子とともにプラスチシジン耐性遺伝子を搭載しているため、薬剤選択により多くの細胞が発現することが期待されるが、たとえすべての細胞がprM/E遺伝子を有していても、細胞の状態（おそらく周期）や細胞内防御機構によりprM/E遺伝子は発現しないでプラスチシジン耐性遺伝子のみを発現する細胞が存在するものと考えられる。クローン化によりこの問題は少し改善するかもしれないが、今のところ通常の

方法（クローニングシリンダーを用いる方法や限界希釈法）ではクローン化に成功していない。expresSF+細胞自体がクローンであるが、クローン化には何か特殊な技術が必要と思われる。

発現蛋白の性状：安定発現したexpresSF+細胞の培養液を蔗糖密度勾配遠心法で分画した。E抗原のピークは、JEV感染C6/36細胞培養液で示されたSHA (Slowly sedimenting hemagglutinin) 粒子のE抗原と同等の密度を示した。この結果は、pIBJEEPを導入し安定発現したexpresSF+細胞からは、E抗原が本来のJEV感染細胞から放出されるSHA粒子と同様に、粒子状で放出されたことを示唆する。

安定発現expresSF+細胞培養液をポリエチレングリコール沈殿法により濃縮後、蔗糖密度勾配遠心法で得られたEPの分画をウエスタンブロット法で解析した。Eに対する抗体 (JE-10B4) あるいはprM/Mに対する抗体 (J2-2F1) により染色されたE及びprMは、糖鎖を切断するPNGaseF処理前及び後のそれぞれにおいて、JEV感染C6/36細胞培養液から精製された本来のウイルス抗原と同等の分子量であった。この結果は、安定発現expresSF+細胞においてE及びprM/Mが正しく発現されていることを示す。なお、発現したprMは、その開裂部位にアミノ酸変異を導入しているため、M蛋白はほとんど検知できない。

D. 考察

(1), (2) VLP形成技術によるJE, WNワクチンの開発

平成21年2月にVero細胞培養不活化新JEワクチンが認可された。この次に位置するより安価/安全なJE-/WN-VLPサブユニットワクチン開発においては、発現細胞親株がバイオ医薬品製造国際基準に合致することが重要である。Vero細胞は当然承認細胞株であるが、JE-VLPはVero細胞にアポトーシスを誘導するためJE-VLP持続発現Vero細胞株樹立はウイルス学的に不成立であることを、我々も小西らも既に論文で報告した。JEVと同一血清型群に属するWNVのVLPにおいてもVero細胞での成功は望めないであろう。ウイルスと感染宿主の間には科学的に未解明な特異的拘束性が多数介在するため、未承認細胞株で成立した方策が承認株でも可能であるとする科学的根拠は無い。個々の事例別に検討が必要である。

本研究では、既に進行中のWN-VLPワクチン開発が本課題で実施可能な状況を得たことから、JE-VLPと併行してWN-VLPワクチンについても微研会との官民共同研究を推進した。まず、ヒト医薬品製造用に認可を受けている細胞株のJEV/WNV感染感受性を検討し、その中からCHO-K1細胞を選