

複製時に単独ではなく、複数のウイルス蛋白質複合体として機能する可能性があり、リバースジェネティックシステムを応用した細胞内機能評価システム構築が必須である。

NoV に代表されるヒトカリシウイルスの感染症は、毎年数百万人規模の冬季急性胃腸炎患者を出すため社会的問題となっており、早急にウイルス流行の予防、制御を行う必要がある。これらのウイルスは培養細胞を用いた増殖系、モデル動物が無く、抗ウイルス薬開発が難航している。さらには現在 35 種類以上あるどの遺伝子型が流行しても良いように対策を立てる必要がある。本研究は、*in vitro* でのハイスループットスクリーニング及び、リバースジェネティックシステムを利用した細胞内動態の評価まで、分子疫学、構造シミュレーション、分子生物学を有機的に結合した、新規抗ウイルス薬剤デザイン基盤の提供と、評価システム構築を目指す。

既存の薬剤（プロテアーゼ阻害剤、ポリメラーゼ活性阻害剤など）、新規にデザインされた薬剤とのドッキングモデル構築、活性阻害予測を横山、本村が行いながら、インビトロでの活性測定システム構築に岡、片山で取り組んだ。小澤は、研究協力者として中部衛生検査センター研究員、天野加奈子とともに、データ蓄積の不足しているヒトノロウイルス ORF1 領域の塩基配列データの取得を行った。

プロテアーゼ、ポリメラーゼについては、横山が、構築に成功した 3D モデルに対し、高速演算が可能なサーバーシステムで分子構造の明らかな薬剤のドッキングモデルを検証し、活性阻害剤のインシリコスクリーニングを施行した。また、マウスノロウイルス (MuNoV) とヒトノロウイルス (HuNoV) のプロテアーゼ構造の比較を行い、MuNoV が HuNoV のモデルとなる得るかを検証した。

#### (倫理面への配慮)

組換え DNA 実験は全て組換え DNA 実験申請を行い、承認を得た上で実験計画に基づいて、認定施設内で実行した。

## B. 研究方法、結果および考察

小澤研究分担者は、Open Reading Frame (ORF) 1 領域の塩基配列が決定されていないヒト NoV の遺伝子型に焦点を絞り、全長遺伝子配列解析を行った。本研究により、NoV における高頻度なゲノムの組換えは、これまでの予想を遙かに上回る頻度で起きており、ゲノム全長塩基配列の蓄積が ORF1 領域の多様性の解明に必須であることが明らかになった。また、組換え体のデータ蓄積は ORF1 と ORF2-3 の組み合わせのパターンを明らかにする可能性がある。組み合わせが明らかになれば、プロテアーゼ、ポリメラーゼの多様性に応じて、これらの配列のみをカセットのようにスワップし、活性阻害剤のスクリーニングに用いることができる。

本村研究分担者は、さらにノロウイルス GII/4 株の配列情報を収集し、ゲノム情報の解析をもとに、2006-2009 秋冬期に全国各地で流行したノロウイルスの分子疫学および核酸及びアミノ酸配列解析を行なった。その結果、ノロウイルスは、ゲノム情報の総合的な変化により、免疫逃避能力と高い感染・増殖能力をバランスよく獲得したウイルスがドミナント株として感染拡大していることが明らかになった。日々蓄積するノロウイルスのウイルス学情報と計算機を用いた蛋白質の構造・機能変化の解析を元として、塩基配列変異がウイルスの病原性変化に及ぼす影響を推測することが可能となるかもしれない。これらの情報を基盤としプロテアーゼ、ポリメラーゼの活性を予測し、阻害剤の開発に利用する可能性を示唆した。

横山研究分担者は、培養細胞で増殖が可能である MuNoV を抗ウイルス薬開発のモデルとして検討した。MuNoV のプロテアーゼ、ポリメラーゼの構造を解析し、HuNoV との比較を行った。主鎖の折り畳みと活性部位アミノ酸の立体配置は、MuNoV と HuNoV 間でよく保存されていた。保存部位と可変部位の位置もよく保存されていた。以上から、MuNoV は、HuNoV のウイルス治療薬などの開発研究に応用できる可能性があることを示唆した。しかし、インシリコスクリーニング専用サーバーの導入が許可されなかったため、網羅的な薬剤のインシリコスクリーニングが実行できなかった。最終年度に導入を申請したスクリーニング専用サーバーにより、これらの研究を実行する予定である。

岡研究分担者は、培養細胞での増殖が可能

な FCV を対象に、バイオセンサー発現細胞を用いたハイスループットなウイルスプロテアーゼ活性検出系構築を試みた。その結果、培養細胞を用いた FCV 増殖阻害物質のスクリーニング手法として、最近開発されたルシフェラーゼセンサー (GloSensor™)、もしくは BRET センサーを応用して、FCV のプロテアーゼ活性検出系を構築することに成功した。

片山研究主任者は、日本で分離された MuNoV-S7 株を用いてウイルス学的解析、全長ゲノム塩基配列の解析、ゲノムの構造解析を行い、MuNoV のリバーシジェネティクスシステム構築の可能性を探った。本研究により、MuNoV タンパク質発現は自身のタンパク質により自己制御されている可能性を明らかにした。また、ポリプロテインの切断順序、実際に機能するウイルスタンパク質の性状が明らかにされた。MuNoV-S7 感染性粒子の細胞内挙動は、HuNoV のリバーシジェネティクス、感染性 RNA のトランスフェクションなどによって得られた結果と類似しており、MuNoV のリバーシジェネティクスシステムは HuNoV の良いモデルとなり得ることが示唆された。

さらに受託研究として、複数のノロウイルス株のゲノム全長 cDNA を哺乳類プロモーター下流にクローニングし、リバーシジェネティクスに用いた。組換えバキュロウイルスで発現させて作製したウイルス様中空粒子 (VLPs) を用いて、株特異的抗血清を作製した。これらを用いて、免疫蛍光抗体法でシステムの評価を行ったところ、これまでに構築に成功した HuNoV U201 株以外に、TCH04-577 株でもリバーシジェネティクスシステムが稼働していることが明らかとなった。また、SaV Mc10 株のリバーシジェネティクスシステムも稼働している可能性が示唆された。

### C. 結論

ノロウイルスの全長ゲノム配列解析を継続し、ポリメラーゼ、プロテアーゼの配列蓄積を行った。新たに HuNoV TCH04-577 株のリバーシジェネティクスシステムを構築した。SaV Mc10 株のリバーシジェネティクスシステムの可能性も示唆した。プロテアーゼ基質認識機構の *in silico* 解析、および *in vitro* 切断評価システムを構築した。MuNoV を HuNoV のモデルとして利用可

能であることを示唆した。

### D. 研究発表

#### 1. 論文発表

(1) Kitajima M., Oka T., Haramoto E., Katayama H., Takeda N., Katayama K., Ohgaki S.

Detection and genetic analysis of human sapoviruses in river water in Japan  
*Applied and Environmental Microbiology. In press*

(2) Iizuka S., Oka T., Tabara K., Omura T., Katayama K., Takeda N., Noda M.

Detection of sapoviruses and noroviruses in an outbreak of gastroenteritis linked genetically to shellfish  
*Journal of Medical Virology. In Press*

(3) Yamashita Y., Ootsuka Y., Kondo R., Oseto M., Doi M., Miyamoto T., Ueda T., Kondo H., Tanaka T., Wakita T., Katayama K., Takeda N., Oka T.

Molecular characterization of sapovirus detected in a gastroenteritis outbreak at a wedding hall.  
*Journal of Medical Virology. In Press*

(4) Oka T., Yokoyama M., Katayama K., Tsunemitsu H., Yamamoto M., Miyashita K., Ogawa S., Motomura K., Mori H., Nakamura H., Wakita T., Takeda N., Sato H.

Structural and biological constraints on diversity of regions immediately upstream of cleavage sites in calicivirus precursor proteins.

*Virology. 2009; 394(1):119-129.*

(5) Kitajima M., Oka T., Tohya Y., Katayama H., Takeda N., Katayama K.

Development of a broadly reactive nested reverse transcription-PCR assay to detect murine noroviruses, and investigation of the prevalence of murine noroviruses in laboratory mice in Japan.

*Microbiology and Immunology. 2009; 53(9):531-534.*

(6) Oka T., Miyashita K., Katayama K.,

- Wakita T., Takeda N.  
Distinct genotype and antigenicity among  
genogroup II sapoviruses.  
Microbiology and Immunology. 2009  
53(7):417-420.
- (7) Shinkawa N., Noda M., Yoshizumi S.,  
Tokutake Y., Shiraishi T., Arita-Nishida  
T., Nishio O., Oka T., Hansman GS., Takeda  
N., Kimura H.  
Molecular epidemiology of noroviruses  
detected in food handler-associated  
outbreaks of gastroenteritis in Japan.  
Intervirology. 2008; 51(6):422-426. Epub  
2009 Mar 4.
- (8) Harada S., Okada M., Yahiro S.,  
Nishimura K., Matsuo S., Miyasaka J.,  
Nakashima R., Shimada Y., Ueno T., Ikezawa  
S., Shinozaki K., Katayama K., Wakita T.,  
Takeda N., Oka T.  
Surveillance of pathogens in outpatients  
with gastroenteritis and  
characterization of sapovirus strains  
between 2002 and 2007 in Kumamoto  
Prefecture, Japan.  
Journal of Medical Virology.  
2009 ;81(6):1117-1127.
- (9) Ootsuka Y., Yamashita Y., Ichikawa T.,  
Kondo R., Oseto M., Katayama K., Takeda N.,  
Oka T.  
Molecular characterization of  
sapoviruses detected in sporadic  
gastroenteritis cases in 2007 in Ehime  
Prefecture, Japan.  
Japanese Journal of Infectious Diseases.  
2009; 62(3):246-248.
- (10) Yoshida T., Kasuo S., Azegami Y.,  
Uchiyama Y., Satsumabayashi K., Shiraishi  
T., Katayama K., Wakita T., Takeda N., Oka  
T.  
Characterization of sapoviruses detected  
in gastroenteritis outbreaks and  
identification of asymptomatic adults  
with high viral load.  
Journal of Clinical Virology. 2009;  
45(1):67-71.
- (11) Iwakiri A., Ganmyo H., Yamamoto S.,  
Otao K., Mikasa M., Kizoe S., Katayama K.,  
Wakita T., Takeda N., Oka T.  
Quantitative analysis of fecal sapovirus  
shedding: identification of nucleotide  
substitutions in the capsid protein during  
prolonged excretion.  
Archives of Virology. 2009;  
154(4):689-693.
- (12) 片山和彦  
ノロウイルス対策  
「高校保健ニュース」, 2009年11月18日号.  
株式会社少年写真新聞社
- (13) 片山和彦  
ノロウイルスについて  
「健康教室」, 2010年1月号 通巻894号 東  
山書房 p74-79
- (14) 片山和彦  
ノロウイルス、ロタウイルス  
ザ特集 最新学校保健安全ハンドブック (書  
籍) p77-80
- (15) 片山和彦、岡智一郎、高木弘隆  
「ノロウイルス研究の現状とマウスノロウイル  
ス」 LABI021 No. 39 p20~26, 2010
2. 学会発表
- (1) 岡智一郎、高木弘隆、遠矢幸伸、武田直和、  
脇田隆宇、片山和彦  
バイオセンサー発現細胞を用いたネコカリシ  
ウイルス感染検出系の構築  
第32回日本分子生物学会年会, 横浜, 2009年  
12月9~12日.
- (2) 本村和嗣、横山勝、大出裕高、中村浩美、  
守宏美、岡智一郎、片山和彦、神田忠仁、田中  
智之、武田直和、佐藤裕徳  
ノロウイルスGII/4ゲノムとキャプシド構造の  
自然界での進化  
第57回日本ウイルス学会学術集会、東京、2009  
年10月25~27日.

(3) 中西章、Benoit Chapellier, 片山和彦、岡智一郎、武田直和  
ノロウイルスを利用した経口ワクチン用ベクター作成の試み  
第 57 回日本ウイルス学会学術集会、東京、2009 年 10 月 25-27 日.

(4) 片山和彦、岡智一郎、脇田隆字  
ノロウイルスリバーシジェネティックシステムのノロウイルスプロテアーゼを利用した制御  
第 57 回日本ウイルス学会学術集会、東京、2009 年 10 月 25-27 日.

(5) 岡智一郎、高木弘隆、遠矢幸伸、武田直和、脇田隆字、片山和彦  
カリシウイルス増殖阻害物質スクリーニング系の構築  
第 57 回日本ウイルス学会学術集会、東京、2009 年 10 月 25-27 日.

(6) 北島正章、岡智一郎、遠矢幸伸、高木弘隆、片山浩之、武田直和、片山和彦  
Nested RT-PCR および Real-time RT-PCR によるマウスノロウイルス核酸検出系の構築  
第 57 回日本ウイルス学会学術集会、東京、2009 年 10 月 25-27 日.

(7) 北島正章、岡智一郎、原本英司、片山浩之、大垣眞一郎、武田直和、片山和彦  
多摩川河川水からのサポウイルスの検出および遺伝子解析  
第 57 回日本ウイルス学会学術集会、東京、2009 年 10 月 25-27 日.

(8) 片山和彦、岡智一郎、高木弘隆、遠矢幸伸、脇田隆字  
マウスノロウイルスの複製機構の解析  
第 57 回日本ウイルス学会学術集会、東京、2009 年 10 月 25-27 日.

(9) 高木弘隆、遠矢幸伸、片山和彦、岡智一郎、杉山和良  
マウスノロウイルス (MNV) のエタノール感受性と粒子、遺伝子への影響について検討  
第 57 回日本ウイルス学会学術集会、東京、2009 年 10 月 25-27 日.

(10) 片山和彦

「ノロウイルス研究の現状とマウスノロウイルスのノロウイルス研究への有用性」  
第 147 回日本日本獣医学会学術集会、日本実験動物医学会シンポジウム、2009 年 4 月 2 日、栃木県宇都宮市

(11) 本村和嗣、横山勝、大出裕高、中村浩美、守宏美、岡智一郎、片山和彦、神田忠仁、田中智之、武田直和、佐藤裕徳、Norovirus Surveillance Group  
ノロウイルス GII/4 の変異  
ウイルス性下痢症研究会第 21 回学術集会、東京、2009 年 10 月 24 日.

(12) Kitajima M., Oka T.,., Katayama K., Takeda N., Haramoto E., Katayama H., Ohgaki S.  
Seasonal distribution and genetic diversity of noroviruses, sapoviruses, and Aichi viruses in river water in Japan.  
15th International Symposium on Health-Related Water Microbiology. Greece, May 31-Jun 05, 2009.

(13) Ueki Y., Shoji M., Okimura Y., Masago Y., Miura T., Omura T., Oka T.,., Katayama K., Takeda N., Noda M., Miyota Y.  
Prevalence and genotypes of sapovirus in wastewater, oysters and gastroenteritis patients in Japan.  
15th International Symposium on Health-Related Water Microbiology. Greece, May 31-Jun 05, 2009.

(14) Kitajima M., Oka T.,., Katayama K., Takeda N., Haramoto E., Katayama H., Ohgaki S.  
Genetic diversity of noroviruses and sapoviruses in river water in Japan.  
109<sup>th</sup> General Meeting of American Society for Microbiology. USA, May 17-21, 2009.

(15) 片山和彦  
日本獣医公衆衛生学会 シンポジウム 「今、問題の食中毒」  
平成 22 年 1 月 31 日 宮崎市 「ワールドコンベンションセンター・サミット」

(16) 片山和彦

希少感染症研修会

下痢症ウイルス ノロウイルス

平成 22 年 2 月 25 日 感染研戸山庁舎共用第一  
会議室

G. 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。

## 免疫調整作用に基づく医薬品探索とその安全性評価 技術の開発

所 属 国立医薬品食品衛生研究所  
研究者 手島 玲子

研究要旨 食品素材等から骨免疫、粘膜免疫、神経免疫系に有効な成分の探索と評価技術開発を行った。骨芽細胞分化促進及び破骨細胞分化抑制を促すもの、培養樹状細胞と培養腸管上皮細胞の機能に影響を及ぼすもの、培養神経細胞の保護作用を有するもの等が見いだされた。

### 研究分担者

- (1) 国立医薬品食品衛生研究所 穂山浩
- (2) 国立医薬品食品衛生研究所 近藤一成
- (3) 千葉大学大学院薬学研究院 戸井田敏彦
- (4) 東京大学大学院農学研究科 戸塚護
- (5) 愛知学院大学薬学部 中西守
- (6) アサヒビール株式会社 田頭素行
- (7) カゴメ株式会社総合研究所 稲熊隆博
- (8) アピ株式会社長良センター 三島敏

### A. 研究目的

近年、社会構造の高度化に伴い、食生活の欧米化が関連していると思われる食物アレルギーや炎症性腸疾患等の粘膜免疫異常疾病、過剰ストレスから起こる多発性硬化症、パーキンソン関連疾患、アルツハイマー等の神経免疫疾患、関節リュウマチや骨粗鬆症等の骨免疫異常疾病等の現代社会に特徴的な疾病が増加傾向にあり、社会問題になりつつある。これら疾病の発症原因は、粘膜免疫系、神経免疫系、骨免疫系が複雑に関連している。本研究はそれらの疾病を予防・治療する医薬品の開発を目的とし、食品素材等から有用な成分の探索を行う。また、動物実験および細胞培養等によるそれらの有効性及び安全性を評価する技術を開発し、医薬品への開発を目指す。具体的には、食品成分中のアレルギー疾患、神経変性疾患、炎症性腸疾患、関節リュウマチや骨粗鬆症等の予防・治療を対象とした有用な有効性活性をもつ素材について、活性成分の探索並びにその機構の解明を行い、併せて有効成分の安全性評価技術の開発を検討する。本研究班の構成は、レギュラトリーサイエンスとしての食品、医薬品にかかる問題をよく知る

国立研究機関の研究者（手島、穂山、近藤）と、品質が高い食品素材の供給ができる食品関連企業の研究者（田頭、稲熊、三島）と、先端的な研究手法の開発が可能な大学の研究者（戸井田、戸塚、中西）からなり、共同研究の形で効率的な研究の遂行をめざしている。

### B. 研究方法

#### [1] プロポリスの骨免疫系を含む免疫影響に関する研究

(i) 試料:アピ株式会社にて調製したブラジル産及び中国産プロポリス抽出物及び含有成分精製品を用いた。使用したプロポリス及び抽出方法は以下のとおりである。

ブラジル産プロポリスはミナスジェライス州で採取された原塊(EGPP (E)、ALECRIM (A)、GREEN (G)、GREEN II (G2)の4種類)、中国産プロポリスは主として河南省で採集された原塊(CHINA (C))を使用した。原塊約100gをハンマーにより破碎後、水または95%エタノール500mLを加えて攪拌抽出した(40℃、16時間)。そして、懸濁液を遠心分離し(2500rpm、10分間)、得られた上清を水抽出物は4℃、95%エタノール抽出物は-20℃で24時間冷却し、蠟分を固化させた。これらを低温下で遠心分離し(4℃、2500rpm、10分間)、得られた上清をNo.2ろ紙を用いて吸引ろ過した。水抽出物は、凍結乾燥機を用いて抽出液を蒸発させて粉末状とした。エタノール抽出液に含まれる固形物量は赤外線水分計(ケット科学研究所)により測定した。

また、プロポリスより精製した主成分としては、ドルパニン、バックリン、アルテピリンC、

p-クマル酸、カフェ酸、クロロゲン酸、3,4-ジカフェオイルキナ酸、3,5-ジカフェオイルキナ酸、3,4,5-トリカフェオイルキナ酸、カフェ酸フェネチルエステル (CAPE)、クリシン、ガラニン、ケンフェノール、3-O-メチルケンフェノール、及びバッカリンの部分構造を形成する3-フェニルプロピオン酸を検討対象とした。

(ii) 活性の測定法: a) 抗アレルギー活性 -- ラット培養マスト(RBL-2H3)細胞からの脱顆粒は  $\beta$ -hexosaminidase の放出を指標とし、サイトカインの放出は、FlowCytomic Multiplex を用いて 6 種測定する系を併用し、プロポリス成分共存による上記マスト細胞活性化への影響を評価した。

b) 骨免疫系への影響

① 骨芽細胞 -- 96 孔マイクロプレート (Corning 社製) にマウス骨芽細胞様細胞株である MC3T3-E1 細胞を播種 ( $3.8 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup>) し、その 3 日後から分化誘導を開始した。プロポリスの水抽出物は 0.001–0.1 % (w/v)、エタノール抽出液は 0.001–0.1 % (v/v)、精製品は 1–100  $\mu$ M (CAPE のみ、0.01–1  $\mu$ M) の濃度範囲で分化誘導培地に添加し、14 日間培養した。その間、培地交換を週 3 回行った。分化誘導開始後 14 日目に、骨芽細胞の成熟期 (培養 10 日~20 日前後) に発現量が高くなるアルカリホスファターゼ (ALP) 活性を、p-nitropheny phosphate の脱リン酸化を検出する比色法により測定し、骨芽細胞への分化の程度を検討した。

② 破骨細胞 -- 96 孔マイクロプレート (Corning 社製) にマウスマクロファージ様細胞株 RAW264.7 細胞を播種 ( $4 \times 10^4$  cells/well) し、同時に、50 ng/mL RANKL (Receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand、R&D Systems 社製) を添加して分化誘導を開始した。検体の濃度範囲は骨芽細胞の場合と同様とし (但し、CAPE のみ 0.01–100  $\mu$ M)、分化誘導開始時に添加した。4 日後、破骨細胞の分化マーカーである酒石酸抵抗性酸ホスファターゼ (TRAP) の活性染色を行った。顕微鏡で画像を取得し、破骨細胞の特徴である TRAP 陽性かつ多核 (核数 > 3 個) の細胞をカウントすることにより破骨細胞への分化の程度を検討した。また、全く同様の処理を行った細胞を用いて、生細胞カウント法である WST-1 アッセイを行い、未分化の細胞も含めた全細胞数を比較した。

## 【II】粘膜炎調整作用に基づく医薬品の探索と評価法の確立

(i) 試料: リンゴのポリフェノールであるリンゴ縮合型タンニン (ACT) については、アサヒビール株式会社にて調製された重合度の違う標品 (1 量体, 2 量体, 3 量体, 4 量体, 5 量体, 6 量体, 7 量体, 8 量体) を用いて検討を行った。

ユーカリ等フトモモ科植物にも分布が知られている大環状エラジタンニン 2 量体の Oenothain B は、松山大学薬学部好村博士より供与されたものを用いた。また、酵母細胞壁由来グルコマンナン (YGM) とそば主要アレルゲン Fag e1 の複合体の研究は、信州大学農学部中村教授と共同で行った。

(ii) 活性の測定法: a) ヒト未成熟樹状細胞への影響 -- ヒト未成熟樹状細胞 (NemodDC, NEMOD Biotherapeutics) に LPS (*E. coli*; O26: B6, Sigma) 存在下、リンゴ縮合型タンニン (1 量体, 2 量体, 3 量体, 4 量体, 5 量体, 6 量体, 7 量体, 8 量体) (100  $\mu$ g/ml) または Oenothain B (25, 100  $\mu$ M) を添加し、37°C、5% CO<sub>2</sub> 条件下で 24 時間培養を行った。培養後、回収した細胞については Annexin-V および Propidium iodide (PI) 処理、または各種蛍光標識抗体 (CD1a, 83, 86) および PI 処理の後にフローサイトメーター (FACS) を用いて測定を行なった。また、細胞培養上清液については、Caspase3/7, Caspase8, Caspase9 などの Caspase 活性の測定、また、Bio-Plex (Bio-Rad) を用いた多項目同時 ELISA 解析でサイトカインを定量することで、DC への各種タンニンによる影響についての検討を行った。

b) マウス小腸由来上皮細胞株への影響 -- 分担研究者の戸塚准教授のグループで樹立された BALB/c 胎仔マウス由来の小腸腸管上皮細胞の初代培養系に (*Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2009: 73(8); 1849–1855), SV40 ラージ T 抗原遺伝子をレトロウイルスベクターを用いて導入し、過剰発現させることにより不死化した。サブクローニングを経て、マウス小腸由来腸管上皮細胞株 MoS13 を得た。MoS13 細胞のサイトカイン産生への重合度の異なる ACT の影響評価法については、以下の通りである。MoS13 細胞の継代時、その細胞懸濁液の一部を回収し細胞数を計数し、細胞懸濁液を  $4 \times 10^4$  個/ml になるように希釈し、2 ml ずつ 12 well プレートに、1 ml ずつ 24 well プレートに、もしくは 0.5 ml ずつ 48well プレートに播種し、2 日間培養して

コンフルエントになった後に使用した。試料の MoS13 細胞に対する毒性は、試料添加 24 時間後に MoS13 細胞から放出される乳酸脱水素酵素 (LDH) 量を指標として検討した。ACT が MoS13 細胞のサイトカイン産生に与える影響を解析するため、MoS13 細胞の培養系に Toll 様受容体 (TLR) の各種リガンドを ACT と同時に添加、あるいは MoS13 細胞を ACT で 24 時間前処理した後、各種 TLR リガンドを添加して培養し、培養上清中のサイトカイン産生量 (IL-6 産生量) を ELISA 法により調べた。TLR リガンドとして、TLR2 の合成リガンドである Pam3CSK4、TLR3 のリガンドである Poly (I:C)、TLR5 のリガンドであるフラジェリンを用いた。また、上記のような培養を行った細胞を回収し RNA 抽出を行い、これを鋳型として cDNA を合成した後、定量的 PCR 法を用いて、サイトカインの mRNA 発現量を調べた。

c) Fag e1-YGM 複合体を用いる動物実験 - ソバ (*Fagopyrum esculentum*) からイオン交換及びサイズ排除クロマトグラフィーで分離精製にて分子量 22 kDa の純粋なタンパク質を得、Fag e1 を調製した。酵母細胞壁由来のグルコマンナン (YGM) を用いた多糖修飾は、Fag e1 と多糖とを一旦混合溶解し、その後凍結乾燥して得られた粉末を 60°C、相対湿度 65% に 1 週間インキュベーションした。得られた反応物は、サイズ排除クロマトグラフィーで分離精製後、ソバアレルギー患者血清との反応性をウエスタン・ブロッティング法、ELISA 等で調べた。次いで、Fag e1-YGM 複合体を BALB/c 由来のソバアレルギーマウスに経口投与し、免疫応答の変化を追跡した。血清中の IgE 量は ELISA、脾臓中に発現されたサイトカイン mRNA 量はリアルタイム PCR 法、脾臓中の T 細胞サブセットバランスはフローサイトメトリー法によってそれぞれ測定した。

### 【III】神経調整作用に基づく食品素材成分の評価と解析

(i) 試料: カロテノイド類としては、カゴメ株式会社より供与されたβ-カロテン、リコペンを用いた。ロイヤルゼリー由来の中鎖脂肪酸としては、アピ株式会社より供与された 10-hydroxy-2-decenoic acid, 10-hydroxy decanoic acid, 2-decenoic acid, decanoic acid を用いた。培地中での溶解性が極めて悪いカロテノイド類はあらかじめ大豆由来のフォスファチジルコリン (soybean PC) を用いてリポソームとする方法を

を検討し、細胞に添加した。

(ii) 活性の測定法- a) 細胞 - 培養神経細胞として、ラット副腎髄質由来 PC12 細胞 (細胞バンク)、ヒト神経芽細胞腫 SH-SY5Y 細胞 (ATCC)、マウス神経とグリアハイブリッド細胞 (ATCC) を主に用いた。通常の培養条件で増殖させ、必要に応じて NGF、レチノイン酸またはブチリル cAMP で分化誘導して実験に用いた。また、オリゴデンドロサイト前駆細胞として、FBD-102b 細胞を用いた。前駆細胞から成熟細胞へは、血清枯渇下にポリリジンコートされた培養フラスコ上で培養することで行った。また、myelin basic protein (MBP) に対する抗体で染色して成熟細胞であることを確認した。b) 神経分化誘導作用 - 主に PC12 細胞を、血清枯渇下でなおかつ NGF 非共存下で 3 日間培養を行い、神経成長を促進するかを神経突起の長さを基準に測定した (ここでは、細胞体の大きさの 2 倍以上に突起形成が見られた物を、効果ありとした)。陽性対象として NGF 処理した細胞を用いた。c) 神経保護作用 - ミトコンドリア電子伝達系複合体 I の阻害剤でパーキンソンモデル動物作成に用いられる MPTP1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydro-pyridine, *in vitro* 実験ではその代謝物 MPP<sup>+</sup> (1-methyl-4-phenyl-1-pyridinium cation)、複合体 II の阻害剤でハンチントンモデル動物作成にも用いられる 3-NP (3-nitro propionic acid)、およびこれまでとは異なるシグナル経路で神経細胞死を誘導することを見出した eleostearic acid (ESA) を刺激剤として用い、それらに対する神経保護作用を WST アッセイにより測定した。

### C. 研究結果及び考察

#### 【1】プロポリスの骨免疫系を含む免疫影響に関する研究

##### (i) 抗アレルギー作用

ブラジル産 4 種及び中国産 1 種のプロポリスの水及びエタノール抽出物を調製し、あわせて 10 種類の抽出物について、ラット好塩基球性白血球細胞 RBL-2H3 の抗原刺激による脱顆粒を抑制する活性を検討した結果、中国産プロポリスのエタノール抽出物が最も強い抑制能を示した。順相カラムクロマトグラフィにより分画を行ったところ画分 C および画分 E に脱顆粒を抑制し細胞毒性のない物質が含まれることが分かった。それぞれの画分を逆相クロマトグラフィにより細分画し、活性成分として画分 C よりクリシン、ガラנגインを、画分 E よりケンフェ



ロール、3-O-メチルケンフェロールをそれぞれ単離同定した (図 1)。これらはいずれもフラボノイドで、A 環全体および C 環 4 位のカルボニル基、2-3 位の二重結合が共通していた。またこれら 4 種類のフラボノイドはブラジル産プロポリスにはほとんどあるいはまったく含まれなかった。

#### (ii) 骨免疫系への影響

試験に用いたプロポリス抽出物は、(i)の抗アレルギー活性評価に用いたものと同じものを用いた。また、ブラジル産プロポリス等から単離された 10 種の成分 (図 2) についても粗抽出物と同様、骨芽細胞と破骨細胞の分化への影響を検討した。

水抽出画分に関しては、骨芽細胞への影響は小さかったが、破骨細胞では、0.1%で細胞数の抑制が観察された。エタノール抽出画分に関しては、0.01%で、骨芽細胞分化促進作用が観察された。また、ブラジル産 4 種については、0.01%で破骨細胞数の抑制が観察された。

プロポリス成分精製品を用いた結果では、骨芽細胞の分化に、カフェ酸、クロロゲン酸、3,4-ジカフェオイルキナ酸、3,5-ジカフェオイルキナ酸および 3,4,5-トリカフェオイルキナ酸、CAPE は、1-100  $\mu\text{M}$  を添加した群と 0  $\mu\text{M}$  添加群の間で ALP 活性に有意な差は見られなかった。続いて、ドルパニン、バッカリン、アルテピリン C、*p*-クマル酸および 3-フェニルプロピオン酸を用いて検討した結果、ドルパニンおよびバッカリンにおいて濃度依存的な ALP 活性の増大が観察され (図 3)、特に 100  $\mu\text{M}$  添加群においては 0  $\mu\text{M}$  添加群と比較して有意な増大が見られた ( $P < 0.01$ )。一方、アルテピリン C においては、顕微鏡観察下では細胞数の低下は観察されなかったものの、濃度依存的に ALP 活性が低下する現象が観察された。*p*-クマル酸および 3-フェニルプロピオン酸では ALP 活性の変化は見られなかった。破骨細胞では、3,4-ジカフェオイルキナ酸、3,5-ジカフェオイルキナ酸および 3,4,5-トリカフェオイルキナ酸に関しては、破骨細胞数の有意な変化は認められなかった。*p*-クマル酸、カフェ酸、クロロゲン酸については、100  $\mu\text{M}$  においては破骨細胞数の減少が見られた。*p*-クマル酸、カフェ酸では全細胞数の減少もある程度観察されたことから、破骨細胞数の減少の一部は細胞毒性によるものと考えられた。また、骨芽細胞において効果が見られたバッカリン、ドルパニン、アルテピリン C については、バッカリン、アルテピリン C

において破骨細胞数が減少する傾向は見られたものの、有意な変化は見られなかった。

CAPE については、10  $\mu\text{M}$  で破骨細胞数の大きな減少が見られたが、全細胞数もコントロールの半分程度に減少しており、破骨細胞数減少の一部は CAPE の細胞毒性によるものと考えられた。

#### 【III】粘膜免疫調整作用に基づく医薬品の探索と評価法の確立

##### (i) リンゴ縮合型タンニン(ACT)の効果

(a) ヒト培養樹状細胞への影響・リンゴ縮合型タンニン添加群においては、PI(+)、Annexin-V(+)(後期アポトーシス)、PI(+)、Annexin-V(-)(初期アポトーシス)の細胞数の割合は、6 量体画分で EGCG や他の画分に比べて有意に増加した。Caspase 活性において Caspase3/7 活性 Caspase8 活性、Caspase9 活性では、Blank 群に比べて対照群とリンゴ縮合型タンニン添加群では有意な減少を認めた。対照(EGCG)群とリンゴ縮合型タンニン添加群を比較すると、タンニン添加群の有意な増加を認めた。

##### (b) マウス小腸由来上皮細胞への影響

ACT を経口投与したマウスでは、小腸で  $\gamma\delta$  型 TCR 陽性 IEL (CD8 陽性のサブプレッサー型の IEL) の増加が認められたことから、小腸由来上皮細胞株である MoS13 細胞に対する ACT の作用を検討した。まず、ACT の MoS13 細胞に対する細胞毒性を LDH 放出量を指標として検討したところ、少なくとも 50  $\mu\text{g/ml}$  までの濃度では MoS13 細胞に対して毒性を示さないことが判明した (データ未掲載)。また、MoS13 細胞に ACT を単独で添加し、5 時間後の IL-6 の産生を ELISA 法で測定したところ、IL-6 産生はほとんど認められなかった。したがって、ACT 自体は腸管上皮細胞の IL-6 産生を誘導する活性を有さないことが明らかとなった (データ未掲載)。

次に様々な TLR リガンドにより誘導された MoS13 細胞の IL-6 産生に対して ACT が与える影響について調べた。Pam3CSK4、Poly (I:C) あるいはフラジェリンと同時に ACT を添加し、5 時間後の IL-6 産生量を ELISA 法で測定した。その結果、ACT は Pam3CSK4 で誘導される IL-6 産生を増強したが、Poly (I:C) で誘導される IL-6 産生は逆に抑制した。また、フラジェリン単独で刺激した場合には培養上清中に IL-6 は検出されなかったが、ACT と同時に加えることで IL-6 が検出された。次に、mRNA

発現レベルでの ACT の作用を検討した。MoS13 細胞に ACT とそれぞれの TLR リガンドを加えて 2 時間後に細胞を回収して RNA を抽出し、IL-6 mRNA 発現量を Real time RT-PCR 法で測定した。その結果、Pam3CSK4 刺激時においては ELISA の結果と同様に IL-6 mRNA 発現が亢進した。また、フラジェリンで誘導される IL-6 mRNA 発現も ACT により若干増強される傾向が認められた。一方、Poly (I:C) 刺激時においては ACT 添加による変化は認められなかった。

ACT は様々な重合度のプロシアニジンの混合物であるため、どの重合度の ACT に上記の活性があるのかについて検討した。それぞれの重合度別に分画した ACT の活性を Fig. 1 と同様の方法で調べた。その結果、Pam3CSK4 で刺激した場合、ACT で認められた IL-6 産生増強作用は 1 mer~4 mer ではほとんど見られなかったが、5 mer~8 mer では IL-6 産生を増強する作用が認められ、特に 5 mer で最も高い IL-6 産生増強作用が観察された。また、フラジェリンで刺激した場合には、IL-6 産生増強作用はほぼ重合度依存的に強くなっており、5 mer で特に強い増強活性が認められた。一方、Poly (I:C) で刺激した場合、ACT の IL-6 産生抑制作用はほぼ重合度に依存して強くなっていることが明らかとなった (図 4)。また、その増強活性は細胞をあらかじめ ACT で前処理しておくことにより、著しく上昇することが明らかとなった。

#### (ii) フトモモ科タンニンの影響

ヒト未成熟樹状細胞 (DC) を TNF- $\alpha$  含有培地を用いて、LPS 添加又は無添加の条件下のもと、フトモモ科にも分布する大環状エラジタンニン二量体である Oenothien B (OeB) を添加し、DC の分化への影響を検討した。OeB 添加群において、DC 上の CD1a、CD83 分子の発現が低下していたことから、DC の分化・抑制が示唆された。また、PI、Annexin V の二重染色の解析において、対照群と比べて EGCG 添加群と OeB 25  $\mu$ M 添加群では、PI(-)、AnnexinV(+) (初期アポトーシス) の有意な変化が認められなかった。一方、OeB 100  $\mu$ M 添加群は、PI(-)、AnnexinV(+) の有意な増加を認めた。以上のことから OeB (100  $\mu$ M) は DC のアポトーシス誘導作用があることが示唆された。

(iii) Fag e1-YGM 複合体を用いる動物実験  
一週間乾熱インキュベーションした Fag e1-多糖類混合粉末を SDS-PAGE にかけたと

ころ、一部ではあるが、両者は互いに反応して、高分子化していることが確認された。そこで高分子画分を分取し、精製後、遊離アミノ基数及びカルボニル基数を調べた。その結果、多糖類の還元末端と Fag e1 の遊離アミノ基とがメイラード反応の初期に起こる Schiff の塩基形成反応及びそれに随伴するアマドリ転移反応によって化学的に共有結合し、Fag e1-多糖類複合体を形成していることが確認された。そこで、Fag e1-多糖類複合体とソバアレルギー患者血清との反応性をウエスタン・ブロッティング法、ELISA 法によって調べたところ、多糖鎖の導入によって Fag e1 のアレルギー性は著しく低減化していることが示された。患者血清によってバラツキがあるものの、Fag e1-多糖類複合体と血清中 IgE との反応性は未修飾物の 5-10%程度までに低下していることが明らかにされた。

次いで、調製された低抗原性 Fag e1-多糖類複合体を BALB/c 由来のソバアレルギーマウスに 6mg/kg-body weight/day, 5 週間経口投与した。その結果、特に酵母細胞壁由来グルコマンナン (YGM) との複合体において、下痢症状の改善や血清中の IgE 量の低下といった顕著なアレルギー症状の改善効果が見られた。Fag e1-YGM 複合体の経口投与によって免疫寛容の状態になったアレルギーマウスの脾臓中の mRNA の変化は、経口投与が進むにつれ、典型的な Th2 型サイトカインであるインターロイキン 4 (IL4) が減少していることが示された。この点について、実際に細胞としてはどのような状態になっているかをさらに調べた。フローサイトメトリー法で分化した CD4 陽性の T 細胞サブセットの状態を調べたところ、Th1 細胞の増加と Th2 細胞の減少が見られ、Th1/Th2 バランスから見てもアレルギー状態から脱却したことが推測された。加えて、制御性 T (Treg) 細胞についても調べた結果、Fag e1-YGM 複合体を経口投与したグループにおいて、Treg 比率の有意な増加が確認された。このようなことを踏まえると、本研究において、経口免疫寛容到達後のソバアレルギーマウスでは Th2 優位の T 細胞サブセットの相互関係を取っていることが示唆された。

#### 【III】神経調整作用に基づく食品素材成分の評価と解析

PC12 細胞を用いて、血清および神経成長因子 NGF 非存在下において、神経分化誘導作用

を検討した。その結果、decanoic acid (50  $\mu$ M)には強い神経分化促進作用が見られた(全体の40%が神経突起形成)。その他の中鎖脂肪酸である10-hydroxy-2-decenoic acid, 10-hydroxy-decanoic acid, 2-decenoic acidには弱いながら神経分化作用が認められた。また、注目すべきは、いずれの細胞も血清枯渇下 NGF 非存在下にも関わらずアポトーシスで細胞死を起こす事がなく、細胞にとって栄養因子として働いていることが示唆されたことである(図5-7)。

次に、カロテノイド類の神経保護作用について検討した。その結果、ミトコンドリア電子伝達系複合体Iの阻害剤MPP<sup>+</sup>刺激に対して、 $\beta$ -カロテンおよびリコペンには共に有意な抑制効果は認められなかったが、3-NP刺激およびESA刺激では、 $\beta$ -カロテンが有意に細胞死を抑制した。さらに、オリゴデンドロサイト前駆細胞に与える影響を、10-hydroxy-2-decenoic acid, 10-hydroxy decanoic acid, 2-decenoic acid, decanoic acidを用いて行った。その結果、コントロール細胞では、オリゴデンドロサイト前駆細胞は血清枯渇下で分化が誘導され、分化誘導後3日以降には細胞はあらゆる方向に蜘蛛の巣状に突起を伸ばし、myelin basic protein (MBP)を細胞全体に発現した。一方、10-hydroxy-2-decenoic acid または 10-hydroxy decanoic acid 共存下で3日間培養した細胞はその分化には影響を与えなかったが、2-decenoic acid または decanoic acid 共存下で培養した細胞は強くオリゴデンドロサイト前駆細胞の成熟細胞への分化を阻害した。この結果は、2-decenoic acid, decanoic acid が PC12 細胞における神経分化誘導作用を示したのと全く逆の結果であった。これらの化合物が分化のシグナルに直接/間接に働く事が示唆され、興味深い。

## E. 結論

### [1] プロポリスの骨免疫系を含む免疫影響に関する研究

ブラジル産および中国産プロポリス原塊から計10種類の抽出物を調製した。抗アレルギー活性に関しては、最もすぐれた脱顆粒抑制活性を示した中国産プロポリスのエタノール抽出物中より活性成分としてクリシン、ガラングイン、ケンフェロール、3-O-メチルケンフェロールの4種のフラボノイドを単離した。これらは共通の構造上の特徴を有していた。

骨芽細胞に関しては、プロポリスのエタノール抽出液、ドルパニンおよびバッカリンが、

MC3T3-E1 細胞の骨芽細胞への分化を促進することを明らかにした。また破骨細胞に関しては、プロポリスの水抽出物、エタノール抽出液で破骨細胞抑制効果が見られ、10種の成分について検討したところ、既に報告のある *p*-クマル酸、カフェ酸、クロロゲン酸、CAPE では分化抑制効果が見られたが、その他の6種の成分では有意な効果は見られなかった。

骨芽細胞については、今後ALPの活性染色、およびアリザリンレッドS染色による石灰化度の検討等、細胞機能を反映する定性試験を行い、より信頼性の高いデータとする必要がある。また、ドルパニンまたはバッカリン添加時の遺伝子の発現量の増減をDNAマイクロアレイにより検討し、骨芽細胞分化促進の作用機序の解明を試みる。

また、破骨細胞に関しては、化合物の構造を考慮し、新たな活性物質の探索を続ける。

さらに、エタノール抽出液等をマウスに投与し、プロポリス成分の骨代謝系への影響を *in vivo* でも検討する予定である。

### [II] 粘膜免疫調整作用に基づく医薬品の探索と評価法の確立

ACTを用いた研究では、ヒト樹状細胞(DC)の初期アポトーシスの細胞数の割合が、他の画分と比較して6量体画分で有意に増加した。しかしCaspase3/7活性Caspase8活性、Caspase9活性においては、すべてのリンゴ縮合型タンニン画分がBlank群に比べ、減少した。この結果から、リンゴ縮合型タンニンの中で6量体画分が最も強いアポトーシス活性を有し、その作用はCaspaseには非依存的に起こることが示唆された。

マウス小腸上皮細胞株MoS13細胞を用いて、腸管上皮細胞の免疫調節機能をターゲットとした有用成分探索のための評価系の構築を行った。この評価系を用いて、これまでに *in vivo* 実験系において抗アレルギー効果および腸管免疫系への作用が認められているACTが腸管上皮細胞に与える影響の解析を行った。その結果、ACTは細菌成分を認識するTLRのリガンド刺激で誘導される腸管上皮細胞のIL-6産生を増強することが明らかとなった。ACTの経口投与により $\gamma\delta$ 型TCR陽性IELの増加が生じたという現象は、腸内細菌由来物質による刺激で産生誘導される $\gamma\delta$ 型TCR陽性IELの増殖、遊走を活性化させる因子(IL-7、IL-15、ケモカインなど)の発現がACTにより増強さ

たためであるという可能性が示唆された。

フトモ科タンニン Oenothlein B を用いた研究では、DC の分化・成熟抑制作用を示すとともに、DC からの炎症性サイトカイン産生を抑えることで DC を介した炎症反応に対して抑制的に作用することが示唆された。

酵母細胞壁由来グルコマンナン (YGM) と Fagel の複合体を用いた研究では、複合体形成によって、ソバ主要アレルゲン Fag e1 のアレルギー性は著しく低減化した。このアレルギー性低減化 Fag e1-YGM 複合体を蕎麦アレルギーマウスに経口投与するとアレルギーマウスのアレルギー症状を改善することができることを明らかにした。

### 【III】神経調整作用に基づく食品素材成分の評価と解析

ロイヤルゼリー由来の中鎖脂肪酸である 10-hydroxy-2-decenoic acid, 10-hydroxy decanoic acid, 2-decenoic acid, decanoic acid は神経分化促進作用を有することが分かった。2-decenoic acid, decanoic acid はオリゴデンドロサイト前駆細胞の分化に対しては分化抑制を示した。カロテノイド類であるβ-カロテンやリコペンには弱い神経保護作用を示した。MPP<sup>+</sup> や 3-NP 刺激ではミトコンドリア内部での活性酸素が関与すると考えられるためカロテノイド類の中でもルテインのような水酸基を有したものがより有効ではないかと考えられた。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

1) Yasuhiro Suzuki, Masahiro Kassai, Tahiro Hirose, Shigeru Katayama, Kosuke Nakamura, Hiroshi Akiyama, Reiko Teshima, and Soichiro Nakamura: Modulation of immunoresponse in BALB/c mice by oral administration of Fag e 1-glucomannan conjugate. *J. Agric. Food Chem.* 57, 9787-9792 (2009)

2) K. Kondo, S. Obitsu, S. Ohta, K. Matsunami, H. Otsuka, and R. Teshima: PARP-1-independent AIF Release and Cell Death Are Induced by Eleostearic Acid, and Blocked by α-Tocopherol and MEK Inhibition. *J. Biol. Chem.*, doi:10.1074/jbc.M109.044206

3) Rika Nakamura, Ryosuke Nakamura, Kayoko Watanabe, Kazuo Oka, Shozo Ohta, Satoshi Mishima and Reiko Teshima: Effects of propolis from different areas on mast cell

degranulation and identification of the effective components in propolis; (*Int. Immunopharmacol.*, review in process)

## 2. 学会発表

1) 中村里香、中村亮介、渡邊佳代子、三島敏、手島玲子 「プロポリスの抗アレルギー作用」 第 82 回日本生化学会大会(2009.10)

2) 渡邊佳代子、中村里香、中村亮介、手島玲子、三島敏「プロポリスの抗アレルギー作用と関与成分」ぎふ EBBF (健康有用天然素材) フォーラム 2009 (2009.12)

3) 中村里香、中村亮介、渡邊佳代子、三島敏、手島玲子「プロポリスの抗アレルギー作用」第 2 回先端創薬医療シンポジウム (2009.12)

4) Hideki Matsuoka, Morio Yoshimura, Hiroshi Akiyama, Kozue Sakata, Yoshiaki Amakura, Takashi Yoshida, Reiko Teshima, Effect of Oenothlein B on cultured human dendritic cells, 2009 年度 第 16 回日本免疫毒性学会(旭川)2009 年 9 月

5) Hideki Matsuoka, Morio Yoshimura, Hiroshi Akiyama, Kazunari Kondo, Kozue Sakata, Yoshiaki Amakura, Takashi Yoshida, Reiko Teshima, Effect of Oenothlein B on cultured human dendritic cells, 第 130 回日本薬学会(岡山)2010 年 3 月

6) 近藤一成, 小櫃冨未, 太田小夜香, 手島玲子 「共役型トリエン, テトラエン脂肪酸によるカスパーゼ非依存性の神経細胞死」第 82 回日本生化学会 (2009, 10 神戸)

7) 近藤一成, 小櫃冨未, 手島玲子「PARP-1 と Caspase の活性化を伴わない, AIF の核移行を介した神経細胞死」第 32 回日本分子生物学会 (2009, 12 横浜)

8) K. Kondo, S. Obitsu, R. Teshima: ERK1/2 is a critical for PARP-1-independent neuronal cell death. *Keystone Symposia on Molecular and Cellular Biology, Cell death pathways: Apoptosis, Autophagy and Necrosis* Vancouver, Canada (2010, 3)

## G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 取得特許

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

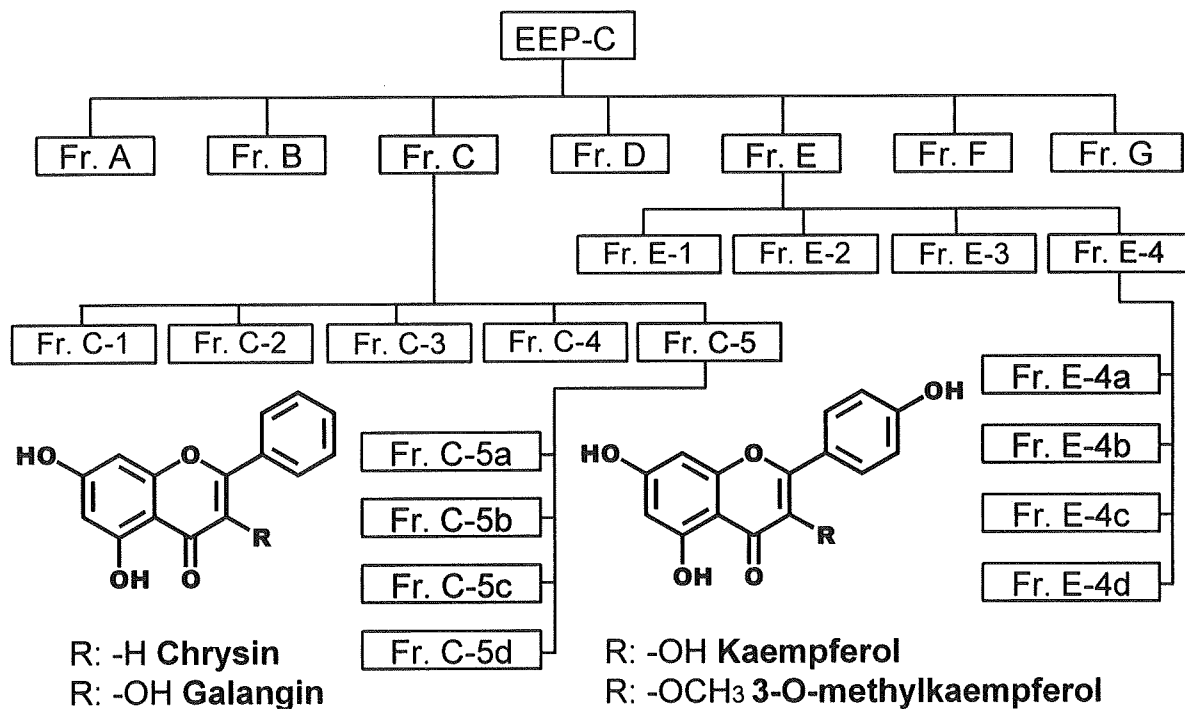


図 1. 中国産プロポリスエタノール抽出物中の抗アレルギー成分の同定

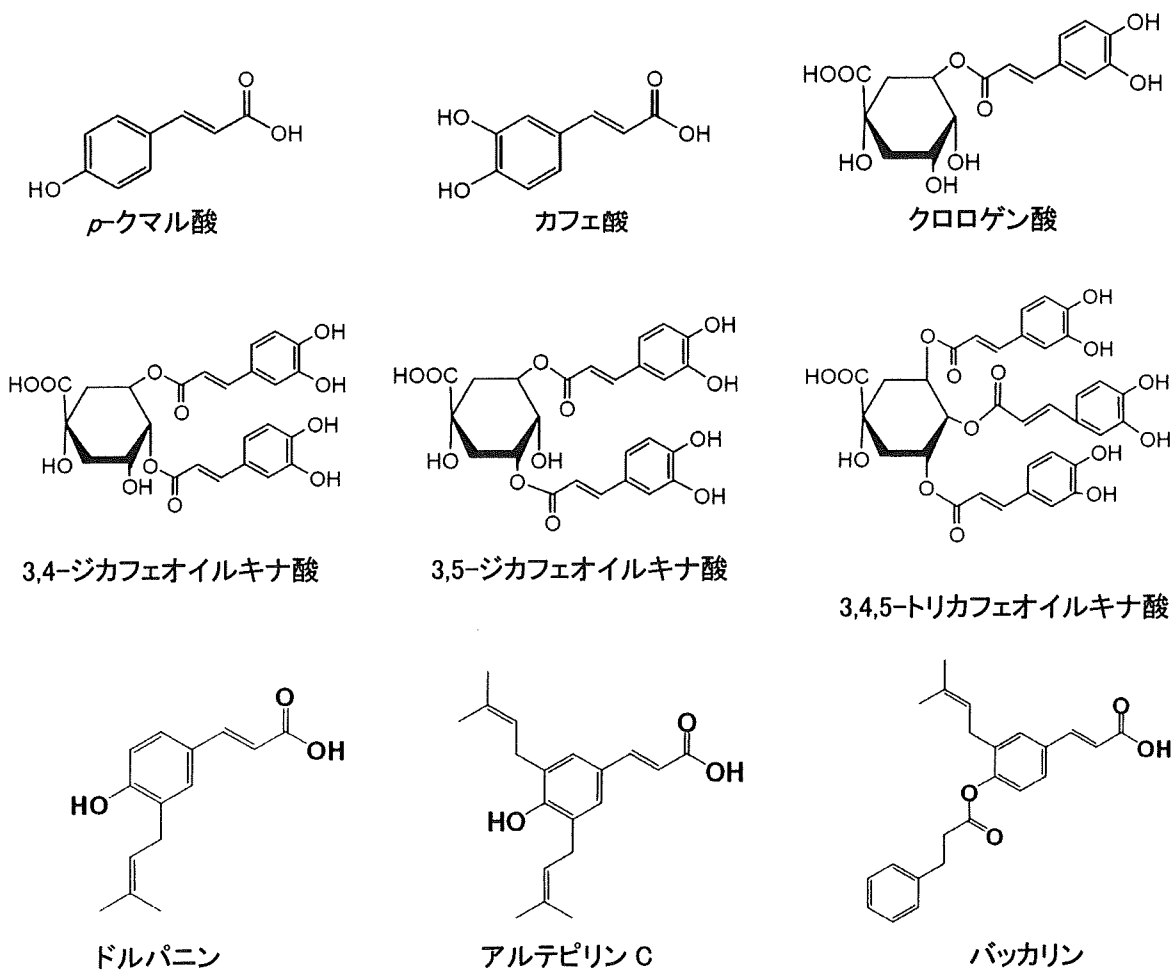


図 2. ブラジル産プロポリスの成分ライブラリー

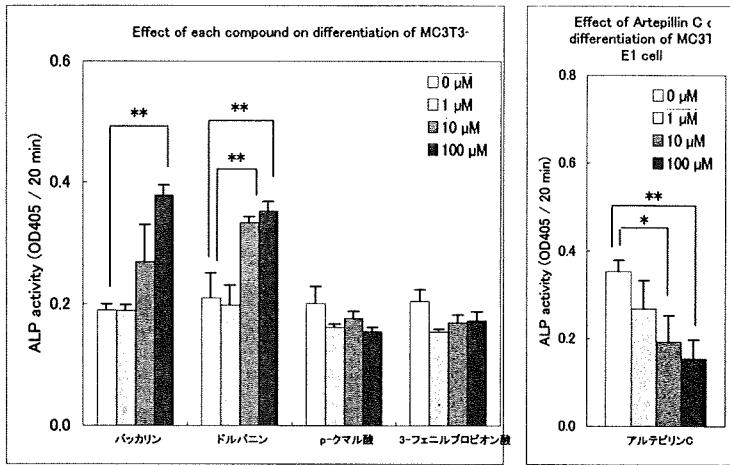


図 3. プロポリス由来桂皮酸誘導体が MC3T3-E1 細胞の分化におよぼす影響(2)

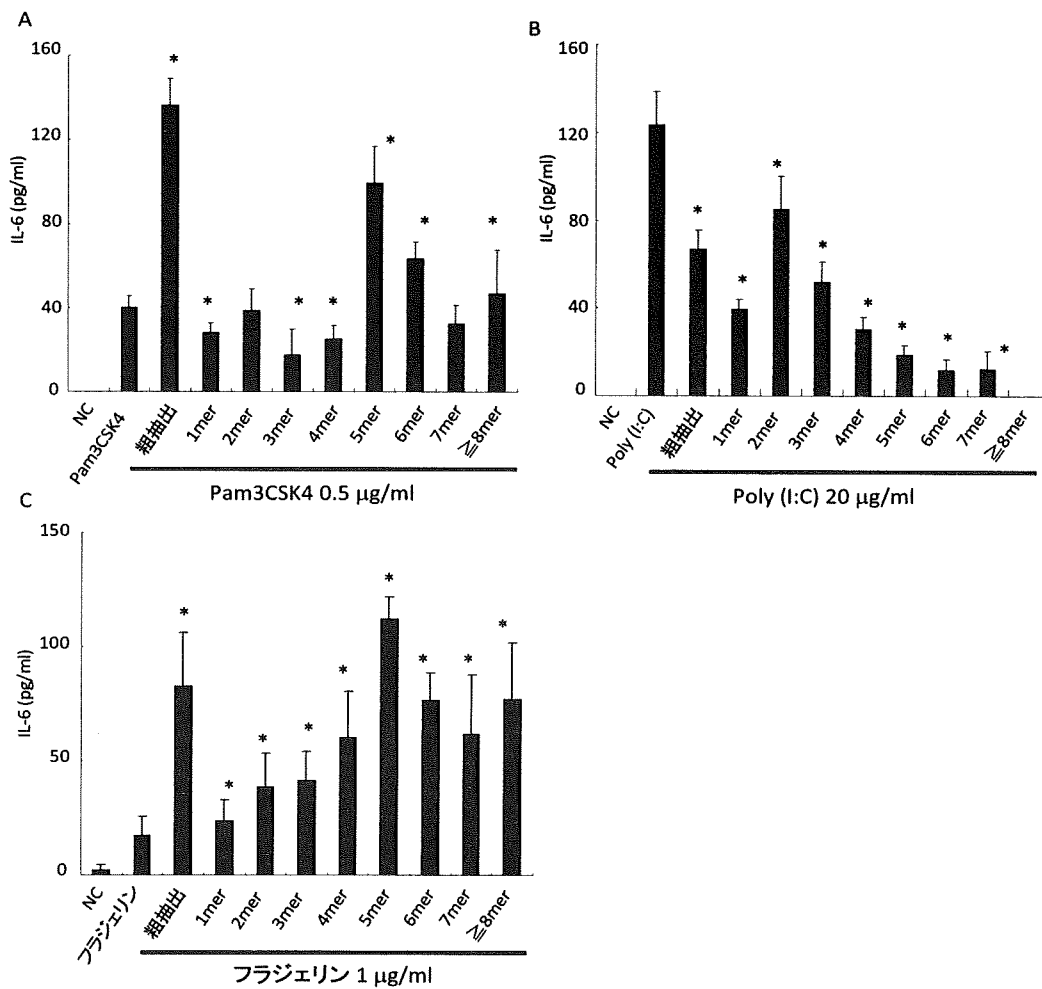


図4 TLRリガンド刺激により誘導されたMoS13細胞のIL-6産生に対して、リンゴポリフェノール(ACT)の重合度別分画物が与える影響

MoS13細胞に通常の培地及び様々な重合度のACT (1~8mer) 50 μg/mlを、Pam3CSK4 0.5 μg/ml、Poly (I:C) 20 μg/ml及びフラジェリン 1 μg/mlと同時に添加し、5時間後のIL-6産生をELISA法で測定した。各値は平均値±SD (n=3)で示した。Williamの方法でそれぞれのTLRリガンド単独刺激群に対して検定し、P<0.05で有意差あり(\*)とした。

fatty acids from loyal jelly

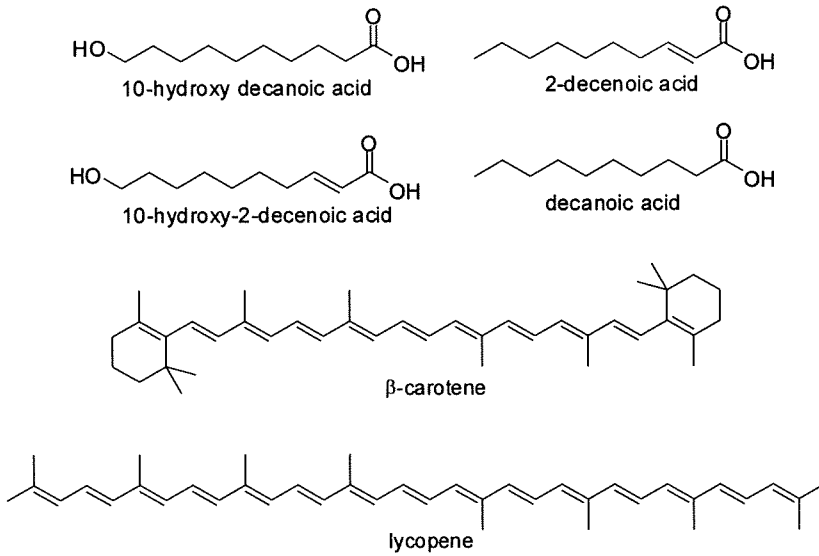


図5 中鎖脂肪酸およびカロテノイド類の構造式

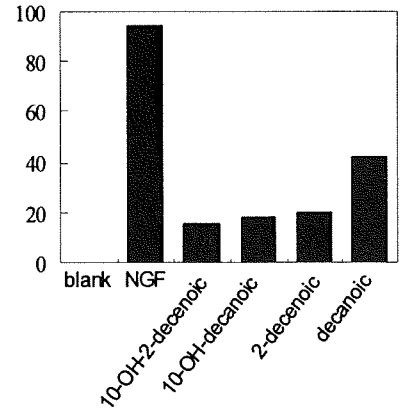
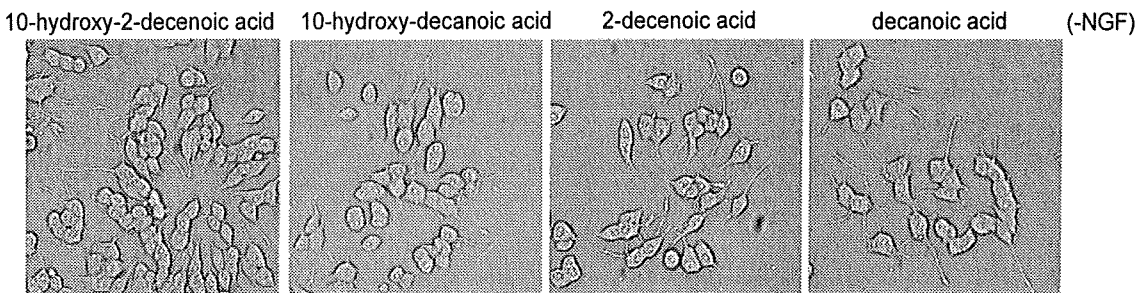
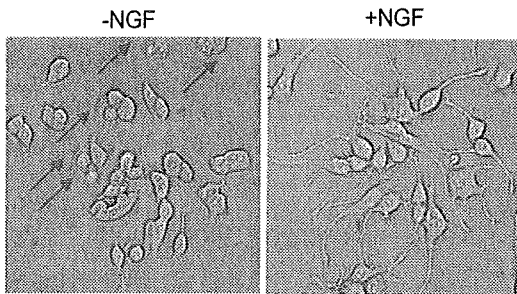


図6 中鎖脂肪酸の神経分化促進作用

Differentiation of PC12 cells, 0.5% FCS on lysine-coated plate for 3 days



cultured for 3 days with acids (50uM), changed media and acids every day  
(up to 200uM, cells are OK and show similar results)

図7 中鎖脂肪酸の神経分化促進作用(形態変化)

## 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  
研究期間 平成19年4月～平成22年3月

**研究要旨** 温暖化で再燃が危惧される日本脳炎ウイルス(JEV)も、我国侵襲の恐れがあるウエストナイルウイルス(WNV)も、蚊が媒介する同一血清型群の極近縁なウイルスである。そこで、小島ら・小西らが独自に開発してきた「表面はウイルスと同等で内部にウイルスゲノムを持たない非感染性ウイルス様粒子(VLP)/細胞外粒子(EP)」新発現技術により、感染性ウイルス大量培養もその封じ込め施設も不要な、それ故安全/安価な理想の JE, WN ワクチンを、医薬品製造国際基準をクリアできる哺乳動物/昆虫細胞を用いて、次世代新規ワクチンに開発すべく研究を推進した。

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) WNV, JEV の prM-E 遺伝子を導入し、安定持続発現細胞及び無血清馴化浮遊細胞株を樹立した。産生された抗原にはウイルス型成熟粒子と小型未成熟粒子の2種があり、ウイルス型粒子は中和抗体誘導に優れ、IgG2a 優位抗体応答を不活化ワクチンと同様に惹起し、ウイルス感染防御効果も勝っている、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、

(2) Sf9 細胞での基礎検討を基に、expresSF+昆虫細胞で JEV prM-E 遺伝子持続発現細胞株の樹立に成功した。産生抗原は免疫原性を有する prM/E 粒子の EP 抗原で、哺乳類細胞を凌ぐ量が産生されることを示した。

### 研究分担者

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

### A. 研究目的

温暖化で再燃が危惧される日本脳炎ウイルス(JEV)も、我国侵襲の恐れがあるウエストナイルウイルス(WNV)も、JE 血清型群の極近縁なフラビウイルスで、中間増幅動物を吸血した感染蚊が媒介して重篤な疾病を引起す。しかし、何れもワクチンによる予防が可能である。研究組織の微研会により組織培養新不活化 JE ワクチンが世界に先駆けて開発(2009年2月認可)され、細胞培養不活化 WN ワクチンも開発されつつある。

そこで次の目標は、①小島/小西らが独自に開発してきた「表面はウイルスと同等で内部にウイルスゲノムを持たない非感染性ウイルス様粒子(VLP)/細胞外粒子(EP)」発現の新技术を用いて、②感染性ウイルスもその封じ込め施設も不要な、それ故安全/安価な理想の JE-, WN-VLP/EP ワクチ

ンを、③実用化の可否を左右するヒト用バイオ医薬品製造国際基準に合致する哺乳動物/昆虫細胞株を用いることにより、④次世代新規ワクチンに開発研究することを目的とした。

### B. 研究方法

(1) 研究組織の国立感染研(小島、高橋、田中)及び阪大微研会(東)は連携/分担して、ヒト用医薬品製造に承認された CHO 細胞を基にした WN-VLP ワクチン; JE-VLP ワクチンを、一方、(2)神戸大学(小西)では米国 FDA がヒト用ワクチン製造に認可した expresSF+昆虫細胞を基にした JE-EP ワクチンを目指し、それぞれ独自に開発した VLP/EP 培養細胞発現技術を駆使して、研究開発に取り組んだ。

(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・承認を受けて実施した。



## C. 研究結果

### (1) 安定に持続発現する哺乳動物細胞株による WN-, JE-VLP ワクチンの開発

①抗体医薬品等の製造に承認された CHO 細胞を基に、WNV の prM-E 遺伝子領域を持続的に発現する安定な細胞クローン CHO-WN12 (#22.6; #22.6.6) を樹立した。②これを無血清培地に馴化させた浮遊細胞系の CHO-WN12S (#22.6S; #22.6.6S) 株樹立にも成功した。③産生 VLP の E, prM/M 糖蛋白はウイルス粒子同様に糖修飾されていることをウエスタンブロット(WB)法で示した。④VLP 抗原はウイルス感染細胞から放出される SHA 粒子比重画分に平衡蔗糖密度勾配遠心(SDGC)法で分画された。⑤この VLP 画分にウイルス(~50 nm)と SHA (~25 nm)サイズの 2 種の粒子が電子顕微鏡で観察された。⑥大/小 2 種 VLP を沈降速度(ゾーナル)遠心法で fast/ slow 分画に分離でき、f-VLP は E と成熟 M、s-VLP は E と prM 前駆体よりなる、各々成熟型/未成熟型 VLP であることを示した。⑦f-VLP 免疫では抗原量(30~270 ng)に依存してマウスの中和抗体価は上昇したが、s-VLP では低下した。⑧f-VLP 免疫で IgG2a 優位の抗体反応が、ウイルス感染・不活化ワクチン接種と同様に誘導された。⑨90 ng の f-VLP 及び s-VLP 免疫で WNV(200 LD<sub>50</sub>)感染に対しマウスは 100%生存したが、f-VLP は少量(3 ng)でも s-VLP より高い防御効果(生存率 83% 対 17%)を発揮した。⑩JE-VLP 産生においても、安定な持続発現 CHO-J12、及び、無血清培地馴化 CHO-J12S クローンを樹立した。⑪産生 JE-VLP は上記 WN-VLP と同様の性状を示し、大/小 2 種の VLP が電子顕微鏡で観察された。

### (2) 昆虫細胞による JE-EP 大量産生系の開発

①JE-EP を産生する Sf9 昆虫細胞発現系を確立した。②発現系で産生された EP は本来の SHA 粒子と同様に SDGC 法で分画され、WB 法で E, prM/M ウイルス抗原で構成される粒子抗原であることを示した。③昆虫細胞由来 EP は哺乳類細胞由来 EP と同等の中和抗体を誘導する免疫原性を有していることをマウス免疫実験で示した。④昆虫細胞は哺乳類細胞より約 10 倍 EP 産生量が高いことを示した。⑤Sf9 細胞で検討した至適条件を基に、ワクチン株として推奨される expresSF+細胞を用い安定発現 exJE 株の確立に成功した。⑥exJE 細胞由来 EP は JEV 本来の SHA 粒子抗原と同等のエピトープを保持し、ワクチン当量約 40~60 µg/ml の E 抗原が安定して回収された。⑦exJE 細胞からの EP 抗原調整法を確立し、アジュバント添加による中和抗体増強効果を示した。

## D. 考察

### (1) 安定に持続発現する哺乳動物細胞株による WN-, JE-VLP ワクチンの開発

上記の結果は、持続発現細胞より産生された WN-VLP, JE-VLP が有望な次世代ワクチン抗原であることを示しているだけでなく、中和抗体が感染防御の主体となるウイルスワクチン開発一般に波及しうる新たな概念を示唆している。即ち、中和抗体の標的はウイルス表面のアミノ酸 1 次配列でなく、立体的 3 次構造エピトープであることを最近の構造生物学は提唱している。従って、E 蛋白よりは VLP、その VLP もウイルスに近似した形態の成熟 VLP であればあるほど、高いワクチン有効性が期待できよう。事実、初めて本研究で見出された大小 2 種の WN-VLP のうち、f-VLP はプロセスされた成熟型 M と E から構成されるウイルスサイズ粒子であり、中和抗体誘導に優れ、高い感染防御能を示した。加えて、WNV 感染では IgG2a 有意の抗体応答が誘導されることも示し、f-VLP が誘導する抗体は不活化ワクチン同様 IgG2a 優位であることから、エピトープ構造もビリオン型の粒子抗原であることを示唆した。一方、JE-VLP においても同様な VLPs の存在が示唆されており、有効性の高い VLP 精製法開発が一層の重要性を増していよう。

### (2) 昆虫細胞による JE-EP 大量産生系の開発

C-(2)項に示した結果は、昆虫細胞が JE-EP ワクチン製造の有力な細胞株になる事を示唆している。昆虫は哺乳類と生物学的分類上大きく異なるため、未知のリスク因子混入可能性が極めて低いことが期待される。また、高密度細胞培養法により大量製造が容易になる。それ故、昆虫細胞は既に市場化されたヒトパピローマワクチンに止まらず承認申請中のインフルエンザワクチン、JEV と同じフラビウイルスの WNV, DENV ワクチン臨床試験への取組等、国際的にも新規ワクチン開発の重要な方策になりつつある。

## E. 結論

(1) 医薬品製造に合致する CHO 細胞株に WNV, JEV の prM-E 遺伝子を導入し、安定持続発現細胞及び無血清馴化浮遊細胞株を樹立した。産生された抗原にはウイルス型成熟粒子と小型未成熟粒子の 2 種があり、ウイルス型粒子は中和抗体誘導に優れ、IgG2a 優位抗体応答を不活化ワクチンと同様に惹起し、ウイルス感染防御効果も勝っていることを示した。

(2) Sf9 及びヒト用ワクチン製造に合致する expresSF+昆虫細胞は、JEV の prM-E 遺伝子導入で

本来の免疫原性を有す粒子抗原を、哺乳類細胞を凌ぐ量産生することを示した。これら基礎検討を基に本来のエピトープを保持した JE-EP 抗原を安定に持続産生する exJE 細胞株の樹立に成功した。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

Ishikawa T, Takasaki T, Kurane I, Nukuzuma S, Kondo T and Konishi E: Co-immunization with West Nile DNA and inactivated vaccines provides synergistic increases in their immunogenicities in mice. *Microbes Infect* 9:1089-1095, 2007.

Kitai Y, Shoda M, Kondo T and Konishi E: Epitope-blocking enzyme-linked immunosorbent assay to differentiate West Nile virus from Japanese encephalitis virus infections in equine sera. *Clin Vaccine Immunol*, 14:1024-1031, 2007.

Yamanaka A, Kosugi S and Konishi E: Infection-enhancing and neutralizing activities of mouse monoclonal antibodies against dengue type 2 and 4 viruses are controlled by complement levels. *J Virol*, 82: 927-937, 2008.

Konishi E, Kitai Y and Kondo T: Utilization of complement-dependent cytotoxicity to measure low levels of antibodies: Evaluation in a model of Japanese encephalitis nonstructural protein 1. *Clin Vaccine Immunol*, 15:88-94, 2008.

Ishikawa T, Widman D G, Bourne N, Konishi E and Mason P W: Construction and evaluation of a chimeric pseudoinfectious virus vaccine to prevent Japanese encephalitis. *Vaccine* 26: 2772-2781, 2008.

Matsunaga T, Shoda M and Konishi E: Japanese encephalitis remains common in Japan. *Pediatric Infectious Disease Journal* 27: 769-770, 2008.

Konishi E, Yagawa K and Yamanaka A: Vero cells infected with vaccinia viruses expressing Japanese encephalitis virus envelope protein induce polykaryocyte formation under neutral conditions. *Jap J Infect Diseases* 61: 410-411, 2008.

Takahashi, H., Ohtaki, N., Maeda-Sato, M., Tanaka, M., Tanaka, K., Sawa, H., Ishikawa, T., Takamizawa, A., Takasaki, T., Hasegawa, H., Sata, T., Hall, W., Kurata, T. and Kojima, A.:

Effects of the number of amino acid residues in the signal segment upstream or downstream of the NS2B-3 cleavage site on production and secretion of prM/M-E virus-like particles of West Nile virus. *Microbes Infect*. 11: 1019-1028, 2009.

Konishi E, Sakai Y, Kitai Y, Yamanaka A: Prevalence of antibodies to Japanese encephalitis virus among inhabitants in Java Island, Indonesia, with a small pig population. *Am J Trop Med Hyg*. 2009;80:856-61.

Yamanaka A, Konishi E: A simple method for evaluating dengue vaccine effectiveness in mice based on levels of viremia caused by intraperitoneal injection of infected culture cells. *Vaccine*. 2009;27:3735-43.

Konishi E, Kitai Y: Detection by ELISA of antibodies to Japanese encephalitis virus nonstructural 1 protein induced in subclinically infected humans. *Vaccine*. 2009;27:7053-8.

Konishi E: Status of natural infection with Japanese encephalitis virus in Japan: prevalence of antibodies to the nonstructural 1 protein among humans and horses. *Vaccine*. 2009;27:7129-30.

小西英二: 日本脳炎ワクチンに関する最近の話題。臨床と微生物, 36: 41-44, 2009.

小西英二: 日本脳炎 DNA ワクチンの開発。臨床獣医, 27: 22-26, 2009.

Konishi E, Tabuchi Y, Yamanaka A: A simple assay system for infection-enhancing and -neutralizing antibodies to dengue type 2 virus using layers of semi-adherent K562 cells. *J Virol Methods*. 2010;163:360-7.

Yamanaka A, Mulyatno KC, Susilowati H, Hendrianto E, Utsumi T, Amin M, Lusida MI, Soegijanto S, Konishi E: Prevalence of Antibodies to Japanese Encephalitis Virus among Pigs in Bali and East Java, Indonesia, 2008. *Japanese Journal of Infectious Diseases* 2010;63:58-60.

Konishi E, Kitai Y, Tabei Y, Nishimura K, Harada S: Natural Japanese encephalitis virus infection among humans in west and east Japan shows the need to continue a vaccination program. *Vaccine*. 2010;28:2664-70.

### 2. 学会発表

Ishikawa T, Kitai Y, Kondo T, Mason P W, Konishi E: Current status of Japanese encephalitis virus circulation in Japan: surveys of antibodies to NS1 and implications of deletions in the 3'-untranslated region. Forty-First Joint Viral Diseases Panel Meeting US-Japan Collaborative Medical Sciences Program, Baltimore, July 2007.

糸田川優、小西英二: 中和活性または感染増強活性を示す抗 Dengue 1 型マウスモノクローナル抗体。第 42 回日本脳炎ウイルス生態学研究会、2007 年 5 月。

井本淳一、石川知弘、山中敦史、小西美佐子、村上賢二、林昌宏、濱野正敬、高崎智彦、宇田川晴英、向田嘉宏、小西英二: ブタ流産予防を目的とした日本脳炎 DNA/蛋白ワクチン混合投与方法及び針無投与方法の併用効果。第 42 回日本脳炎ウイルス生態学研究会、2007 年 5 月。

北井陽子、近藤高志、小西英二: 新しい日本脳炎ウイルス NS1 抗体測定法: 補体媒介性細胞傷害の利用。第 42 回日本脳炎ウイルス生態学研究会、2007 年 5 月。

山中 敦史、小西 英二: ウイルス血症に対する防御を評価するマウスモデルの確立: Dengue 2 型ウイルスを用いた予備的検討。第 42 回日本脳炎ウイルス生態学研究会、2007 年 5 月。

岡本成史、吉井洋紀、小島朝人、石川豊数、明石 満、高橋理明、山西弘一、森 康子: アジュバントとの併用による効果的な日本脳炎ワクチンの 1 回接種法の検討。第 55 回日本ウイルス学会学術集会、2007 年 10 月。

井本淳一、石川知弘、山中敦史、小西美佐子、村上賢二、林昌宏、濱野正敬、高崎智彦、小西英二: ブタにおける日本脳炎 DNA/蛋白ワクチン混合針無投与方法の有用性評価。第 55 回日本ウイルス学会学術集会、2007 年 10 月。

桑原三和、小西英二: 昆虫細胞を用いた Dengue 蛋白ワクチン大量生産系確立の基礎的検討。第 55 回日本ウイルス学会学術集会、2007 年 10 月。

北井陽子、近藤高志、小西英二: 補体を利用した日本脳炎ウイルス NS1 抗体測定法の開発。第 55 回日本ウイルス学会学術集会、2007 年 10 月。

山中敦史、小西英二: Dengue ワクチンの防御効力を評価するマウスモデル。第 55 回日本ウイルス学会学術集会、2007 年 10 月。

酒井陽平、小西英二: インドネシアにおける日本脳炎ウイルス抗体保有状況の調査。第 55 回日本ウイルス学会学術集会、2007 年 10 月。

糸田川優、小西英二: 抗 Dengue 1 型マウスモノ

クローナル抗体を用いた中和活性及び感染増強活性の解析。第 55 回日本ウイルス学会学術集会、2007 年 10 月。

岡本成史、吉井洋紀、小島朝人、石川豊数、明石 満、高橋理明、山西弘一、森 康子: ポリ- $\gamma$ -グルタミン酸ナノ粒子の日本脳炎ワクチンアジュバントとしての可能性。第 11 回日本ワクチン学会学術集会、2007 年 12 月。

Yamanaka A, Kosugi S and Konishi E: Antibody-dependent enhancement of dengue virus infection controlled by complement levels. The 42nd Joint Viral Diseases Panel Meeting US-Japan Collaborative Medical Sciences Program. May, 2008

Ohtaki N, Takahashi H, Takasaki T, Sata T and Kojima A: Production and evaluation of virus-like particles of West Nile virus from mammalian cell clones as a novel subunit vaccine. International Union of Microbiological Societies (IUMS2008); XIV. International Congress of Virology (10-15 August 2008, Istanbul).

Atsushi Yamanaka, Yohei Sakai, Eiji Konishi: High prevalence of antibodies to Japanese encephalitis virus among inhabitants in Java Island, Indonesia, relative to a small pig population. The Forum of the Network of Research Centers on Infectious Diseases Conference. Hanoi, Vietnam, October, 2008

Yamanaka A, Soegijanto S, Rantam F A and Konishi E: A simple method for evaluating dengue vaccine effectiveness using mice. Asian-African Research Forum on Emerging and Reemerging Infections-2008, Hokkaido, Japan, December 2008

Yamanaka A, Soegijanto S, Fedik A, Rantam F A, Wardhani A P, Helen Susilowati H, Hendrianto E and Konishi E: Complement levels control enhancing and neutralizing activities of mouse monoclonal antibodies against dengue viruses. Asian-African Research Forum on Emerging and Reemerging Infections-2008, Hokkaido, Japan, December 2008

山中敦史、酒井陽平、小西英二: インドネシアのジャワ島住民における日本脳炎ウイルス抗体保有状況。第 43 回日本脳炎ウイルス生態学研究会。2008 年 5 月

北井陽子、近藤高志、小西英二: ウェストナイルウイルス感染を鑑別する補体利用の抗体測定法。

第43回日本脳炎ウイルス生態学研究会。2008年5月

大滝尚広、高橋秀宗、田中恵子、石川豊数、東 雍、佐多徹太郎、小島朝人：哺乳動物細胞クローンをを用いたウエストナイルウイルス様粒子ワクチン産生系樹立と有効性評価に関する基礎的検討。第56回日本ウイルス学会学術集会、2008年10月、岡山。

岡本成史、松浦正明、小島朝人、石川豊数、明石 満、高橋理明、山西弘一、森 康子：アジュバント—日本脳炎ワクチンの1回接種での防御免疫応答の持続性と免疫学的機構。第56回日本ウイルス学会学術集会、2008年10月、岡山。

宮川優子、山中敦史、小西英二： Dengue 2 型ウイルスを用いたマウスモデルにおける中和抗体のウイルス血症防御能。第56回日本ウイルス学会学術集会。2008年10月

北井陽子、近藤高志、小西英二：補体を利用したウマ血清中ウエストナイルウイルス特異的 NS1 抗体の測定。第56回日本ウイルス学会学術集会。2008年10月

北井陽子、白藤浩明、金平克史、神尾次彦、近藤高志、小西英二：日本脳炎ワクチン接種後にウエストナイルウイルス(WNV)を実験感染したウマ血清中の WNV 特異 NS1 抗体測定：ブロッキング ELISA 法と CDC 法の評価。第15回トガ・フラビ・ペスチウイルス研究会。2008年10月

桑原三和、小西英二：日本脳炎ワクチン抗原を連続産生する昆虫細胞株の樹立。第12回日本ワクチン学会学術集会。2008年11月

Mason P W, Widman D, Ishikawa T, Bourne N, Suzuki R, Winkelmann E, Frolov I, Carrion R and Konishi E: Engineering third-generation vaccines for West Nile encephalitis, Japanese encephalitis, and dengue. The 1st Pan-American Dengue Research Network Meeting. Recife, Brazil, January 2009

Atsushi Yamanaka, Yuko Tabuchi and Eiji Konishi: A method to measure both infection-enhancing and neutralizing antibodies against dengue type 2 virus using K562 cell layers. Forty-third Joint Working Conference on Viral Diseases US-Japan Cooperative Medical Science Program, Philadelphia, 2009年7月

Atsushi Yamanaka, Yuko Tabuchi, Eryk Hendrianto, Amor P Ginting, Dian Dwi Sary, Soegeng Soegijanto, and Eiji Konishi: Development of a method to measure both

infection-enhancing and neutralizing antibodies against dengue virus, and its application to clinical samples. The 9th Awaji International Forum on Infection and Immunity, Hyogo, 2009年9月

Atsushi Yamanaka, Eryk Hendrianto, Amor P Ginting, Dian Dwi Sary, Soegeng Soegijanto, and Eiji Konishi: Relationship between complement activity and disease severity in dengue fever and dengue hemorrhagic fever patients in Indonesia. The International Joint Forum on Infectious Diseases, Bangkok, 2009年9月

菊川明子、藤田武、五味康行、真鍋貞夫、石川豊数、奥野良信、東 雍、大滝尚広、高橋秀宗、佐多徹太郎、小島朝人：ウエストナイルウイルス様粒子 (WN-VLP) の性状解析。第44回日本脳炎ウイルス生態学研究会、2009年6月、千歳。

山中敦史、Eryk Hendrianto、Amor P Ginting、Dian Dwi Sary、Soegeng Soegijanto、小西 英二：インドネシアの Dengue 熱・ Dengue 出血熱患者における血清中の総補体価 CH50 の測定。第44回日本脳炎ウイルス生態学研究会、2009年6月

北井 陽子、原田誠也、西村浩一、田部井由紀子、小西 英二：NS1抗体測定による近年の日本脳炎ウイルス自然感染率の調査。第44回日本脳炎ウイルス生態学研究会、2009年6月

桑原三和、小西英二：昆虫細胞由来フラビウイルス蛋白の診断およびワクチン抗原への適用。第44回日本脳炎ウイルス生態学研究会、2009年6月

大滝尚広、高橋秀宗、石川豊数、東 雍、佐多徹太郎、小島朝人：ウエストナイルウイルス様粒子抗原の形態が免疫原性に与える影響。第13回日本ワクチン学会学術集会、2009年9月、札幌。

山中敦史、Kris Cahyo Mulyatno、Helen Susilowati、Eryk Hendrianto、Takako Utsumi、Mochamad Amin、Maria Inge Lusida、Soegeng Soegijanto、小西英二：2008年インドネシアのバリ及び東ジャワ州の飼育ブタを対象とした日本脳炎抗体保有状況調査。第16回トガ・フラビ・ペスチウイルス研究会、2009年10月

田淵裕子、山中敦史、小西英二：準接着系K562細胞を用いた Dengue 2 型ウイルスに対する感染増強活性及び中和活性の同時測定法。第16回トガ・フラビ・ペスチウイルス研究会、2009年10月

大滝尚広、高橋秀宗、金子(田中)恵子、石川豊数、東 雍、佐多徹太郎、小島朝人：ウエストナイルウイルス様粒子ワクチンの開発：粒子形態が免疫原性に与える影響。第57回日本ウイルス学会