

析データは未だ得られていない。更に臨床で用いられている唯一の IN 阻害剤 *raltegravir* についても IN との複合体の結晶が得られていない事から、その結合の態様は不明である。予備的な生化学的及び構造学的データが、IN は二量体あるいは四量体となって初めてその酵素活性を発揮する事を示唆しているが、そのダイナミクスは不明のままである。本研究では HIV の IN の多量体化のダイナミクスを BiFC-based HIV expression assay と種々の *mutated/truncated* IN を用いて明らかにし、得られた知見を基に新規 IN 阻害剤開発へと進める。

B. 研究方法

1) 検討中の化合物の抗 HIV-1 活性評価及びより有望な化合物の開発・評価：抗 HIV-1 活性の評価には MTT、MAGI アッセイなどを用いるが、有望なものについては耐性株を含む複数のウイルス株での活性を更に検討するため、p24 アッセイを行う。このアッセイの評価には全自動化学発光度測定機：Lumipulse F を用いる。このようにして見いだされたより有望な化合物について前臨床試験の準備を進める。

2) 抗 HIV-1 作用発現のメカニズム解析：新規化合物がウイルス、あるいは生体（細胞）へ与える変化、それがどのようにして抗 HIV-1 効果をもたらすかについて解析を進める。この研究には多数の HIV-1 クローンの作成・検討が必要で、しかも HIV-1 の広範な遺伝子部分についての検索が必要とされるが、high throughput の DNA sequencer：AB3130 Genetic Analyzer を用いることにより迅速な実験データの解析が可能となる。

3) 薬剤耐性のメカニズム解析：HIV-1 が極めて高い増殖能を有し、しかも逆転写酵素 (RT) が error-prone であるという特性のために、HIV-1 の薬剤耐

性発現は不可避である。新規化合物については、試験管内で耐性 HIV-1 変異株の誘導を試み、更にそのようにして誘導された HIV-1 についてのウイルス学・生化学・遺伝子的解析を用いて耐性発現のメカニズム解析を行う。加えて X 線結晶解析をはじめとするタンパクの微細構造研究の方法論を用いて、多剤耐性 HIV-1 株の発現機序の分子・原子レベルでの解析を行う。その後、構造を基礎とした高い抗ウイルス活性を有しかつ耐性の発現に抵抗する薬剤のデザイン・再デザインを行う。

4) HIV-1 PR 2 量体形成阻害効果の解析：HIV PR の作用にはその 2 量体化が重要であり、結晶解析等によるタンパクの分子レベルでの詳細な解析に加えてこれらタンパクの多分子間の相互作用を検討することで新しい作用機序を持つ抗 HIV 薬開発の可能性が考えられる。我々は CFP/YFP タグ付き PR を有する感染性組み換え HIV-1 クローンと FRET (fluorescence resonance emission transfer) の系を用いて、HIV-1 PR 2 量体形成を確認する系を確立した。PR 2 量体形成に重要とされるアミノ酸 (Asp29、Arg87、Thr26 *etc*) 置換を有する種々の CFP/YFP タグ付き変異体を多数作成、FRET の系を用いてこれらのアミノ酸置換が 2 量体形成を阻害することを明らかとした。今後は変異 PR や新規にデザインした化合物が PR 2 量体形成に与える影響などを検討、2 量体形成に重要とされるアミノ酸の詳細な解析を進め、新たな HIV-1 PR 阻害の機序を明らかにする。

5) これまでに我々が開発してきた化合物群の構造活性相関から新規の化合物をデザイン・合成し、それらの HIV-1 PR に対する抑制活性を検討した後、MT-2, MT-4, PHA 刺激ヒト末梢単核球などを標的細胞とした詳細な抗 HIV-1 活性を検討する。

6) HIV-1 IN 多量体の分子学的解析：本研究では

HIV IN の多量体化のダイナミクスを BiFC-based HIV expression assay と種々の mutated/truncated IN を用いて明らかにし、耐性発現の分子的機序を明らかにするとともに新規の IN 阻害剤をデザイン・合成・同定して臨床開発へと進める。具体的には、IN 多量体形成機序に対する分子学的・構造学的解析を進めるために、我々は蛍光蛋白 YFP の改良型変異体である Venus 蛋白をコードする遺伝子の N 末端側 173 アミノ酸配列および C 末端側 83 アミノ酸配列を、それぞれ PMR (PCR mediated recombination) 法を用いることにより野生 HIV-1_{NL4.3} の IN に隣接する形で導入した変異 HIV 株を作成し、これらを COS7 細胞もしくは HEK293 細胞に共発現させ、細胞内で IN が多量体を形成した場合に起こりうる N 末端側と C 末端側が補完された (complement) 完全長 Venus 蛋白による蛍光を共焦点顕微鏡下で観察する手法である BiFC-based HIV (IN) expression assay の確立を現在我々は進めている。過去の報告および IN モノマー同士の docking model により導かれた IN の多量体化に重要であると考えられる複数のアミノ酸の変異を、N 末端側もしくは C 末端側 Venus を付与した IN を含む HIV-1 変異株にそれぞれ site directed mutagenesis 法を用い導入した複数の変異体を既に作成しており、これらを用いて BiFC-based HIV (IN) expression assay で継続的な解析を行っており、また本実験系の更なる optimization を同時に進めている。

(倫理面への配慮)

開発中の化合物の臨床試験導入に際して、まず動物実験などでその安全性を十分に確認する。さらに医学部・大学内の該当する IRB で倫理面での適合性について許可を申請、認可された後で試験を開始する。他方で臨床応用に必要な検討事項につ

いても検討して、同時に大手製薬企業へのライセンス化を図る。

C. 研究結果

我々は広いスペクトラムの薬剤耐性株に高い活性を発揮する PI, TMC114/darunavir/Prezista (DRV) を分担研究者の米国 Purdue University の Dr. Ghosh グループとの共同研究で開発 (Koh & Mitsuya *et al*, *Antimicrob Agents Chemother.* 47: 3123-3129, 2003: 図 1) した。DRV は 2006 年に米国 FDA に認可、本邦でも臨床に供されている。2008 年に 1 日 1 回投与の初回治療薬として FDA に認可されるに至り、今後の HAART の中心的な薬剤となる可能性が極めて高い。

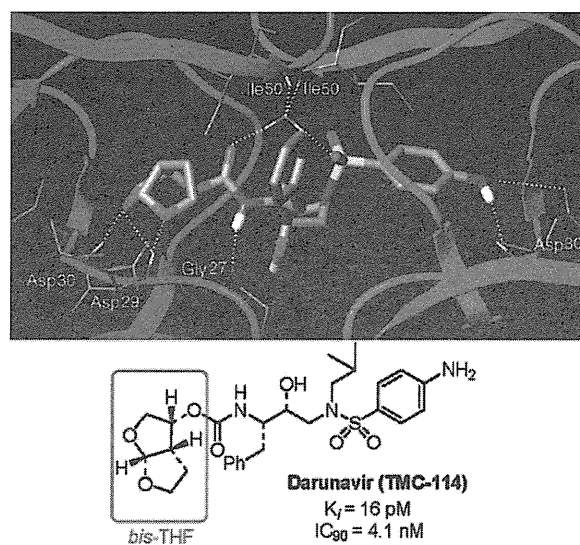


図 1. Darunavir の化学構造と PR との結合様式。

PR の酵素活性中心部位のアミノ酸 (Asp-29 と Asp-30) の主鎖と強力な水素結合を形成している。

また、蛍光蛋白 GFP の誘導体である CFP/YFP を用いた FRET-HIV 発現系を用いて、HIV PR の作用に必須である PR の 2 量体化を阻害する一群の 2 量体形成阻害剤 (PR dimerization inhibitors; PDIs) を分担研究者の Dr. Ghosh らと開発、DRV や後述する GRL-98065 等の bis-tetrahydrofuranylurethane (bis-THF) 構造及びその類似構造を有す

る一連の化合物が成熟 PR の酵素活性を阻害するのみならず、HIV PR 2 量体形成阻害活性を有する bi-functional PI であることを報告した (Koh & Mitsuya *et al*, *JBC*. 282: 28709-20, 2007)。

さらに我々のグループは試験管内における DRV の研究を続けており、複数の多剤耐性臨床分離 HIV-1 混合株を用いた耐性誘導実験において、複数の PI 耐性変異体の重感染と遺伝子相同組み換えが起こることで、HIV-1 が DRV に対する高度耐性を獲得する可能性があることを見出した (Koh, & Mitsuya *et al*, *J Virol*. 84: 11961-11969, 2010)。また我々は海外研究者と共同で、構造解析学的データに基づき DRV と同様に P2 部位に bis-THF 構造を有し、更に P2'部位の benzodioxole 構造が HIV-PR の flap 領域と水素結合を持つ事で薬剤の結合を安定化させ、多剤耐性株に対して強力な活性を発揮する新規 PDI、GRL-98065 (Amano & Mitsuya *et al*, *Antimicrob Agents Chmeother*. 51: 2143-55, 2007) や、DRV とは異なる基本骨格である cyclopentanyl-tetrahydrofuran (Cp-THF)を有し、HIV-1 PR の活性中心部位に2つの異なる結合様式 (bimodal binding mode) で結合することにより、多剤耐性臨床分離 HIV-1 株に対して野生株と同等 (EC₅₀ 値で 2 倍以内) の高い活性を発揮する新規 PI, GRL-02031 (Koh & Mitsuya *et al*, *Antimicrob Agents Chemother*. 53: 997-1006, 2009) を同定・開発してきたが、更に macrocyclic 構造という特徴的な構造を有し、薬剤耐性 HIV に対して高い活性を発揮する一連の低分子化合物、GRL-0216A, -0286A 等の PDIs を同定、詳細な結晶構造解析により同構造が HIV-PR flap 部位に対し効果的に結合する事で強力な活性を発揮する事を見出した (Tojo & Mitsuya *et al*, *Antimicrob Agents Chemother*. 54:3460-3470, 2010 : 図 2)。

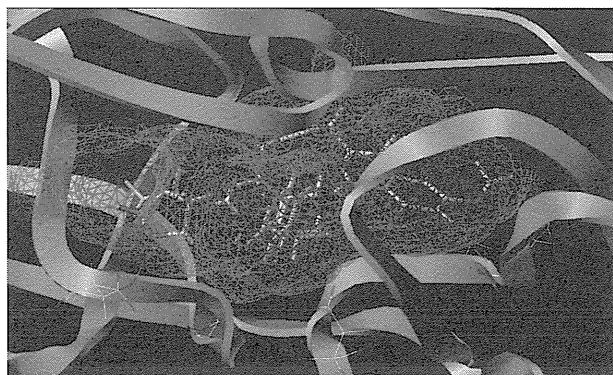


図 2. GRL-286A の HIV-1 PR 活性中心部位への結合様式。

構造解析により macrocyclic 構造が HIV-1 PR の活性中心部位に fit し、下から押し上げる形で効果的に flap 領域に作用していることが判明した。

加えて tetrahydropyrano-tetrahydrofuran (Tp-THF) という bis-THF とは異なる基本骨格を有する PIs である 2 つの異性体、GRL-1388A, -1398A を同定、DRV 高度耐性株を含む多剤耐性株に対して極めて強力な活性を発揮する事を確認、同化合物群に対する HIV-1 の耐性獲得の機序について詳細に検討し、また結晶構造解析により GRL-1398A は DRV と比較して HIV PR との水素結合や hydrophobic contacts 等の相互作用をより多く有しうる事などを報告した (Ide & Mitsuya *et al*, *Antimicrob Agents Chemother*. 55:1717-1787, 2011 : 図 3)。

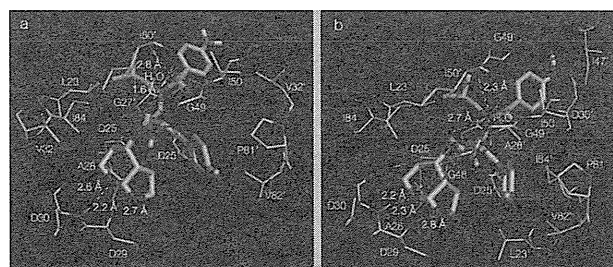


図 3. 薬剤耐性 HIV に対して高い活性を発揮する新規の低分子化合物、GRL-1388A (a), -1398A (b)における HIV-1 PR との結合様式を点線で示す。両者は DRV と同様に HIV PR 活性中心部位である Asp-29, 30 の主鎖と強固に結合することが判明した。

一方、IN 阻害剤(INI)は既に本邦でも臨床導入されているが、HIV は比較的速やかに INI に対する

耐性を獲得し治療に抵抗する事が知られており、耐性発現の分子機構の解明と耐性発現に抵抗する新規 INI 開発が急務である。また DRV が本邦でも臨床で用いられる様になり、多くの患者で高い臨床効果と耐性発現の著しい遅延（或は耐性化しない）が確認されているが、複数の従来型 PIs 長期投与歴を有する患者群で既に DRV 耐性株が確認されており、更に高い抗 HIV 活性と耐性発現に抵抗する新規薬剤開発の必要性は論を待たない。

本研究では現時点でも不明である IN と PR の多量体化のダイナミクスの解明を進めるが、得られるデータは HIV 増殖機構の基礎的理解を深める事となる。加えるに、酵素蛋白の分子間相互作用はいかなる種類の蛋白であっても殆ど不明なままであり、IN/PR モノマーの分子・原子レベルでの多量体化機構の理解は、ヒト・動物細胞や微生物の蛋白間での相互作用の基礎的理解を深める事となる。

D. 考察

満屋グループと Ghosh グループが共同で開発、2006 年に FDA に認可、臨床応用された *bis*-THF を「核」として有する DRV は既存の PIs が主として PR 活性部位の側鎖に結合するのと異なり、主要活性部位である Asp-29/Asp-30 の主鎖と極めて強固な水素結合を形成し、多剤耐性株を含む広いスペクトラムの HIV に活性を発揮する。

本計画では、HIV-1 PR/IN の多量体形成過程での新規の分子機構を明らかにすることを目的とし、更に HIV 増殖抑制の標的となりうる新たな分子、構造の同定、治療法の確立を目指した。HIV の増殖、複製に必須である HIV PR の 2 量体化を検出する系として、HIV PR とレポータータンパクの融合タンパクの発現系とその解析系

(fluorescence resonance energy transfer/FRET 法) を申請者らは確立し、2 量体形成阻害効果を有する一連の低分子化合物 PDI 米国の Dr. Ghosh の研究チームとの共同研究で同定・開発、今後は更に有望な候補薬の同定・開発を進めていく。更に IN の多量体化のダイナミクスを BiFC-based HIV expression assay と種々の mutated/truncated IN を用いて明らかにし、耐性化に抵抗しうる新規の IN 阻害剤をデザイン・合成・同定して臨床開発へとつなげる。

また、DRV、GRL-98065 等の PDI 耐性 HIV-1 で PR 領域に蓄積を認めたアミノ酸変異の解析や HIV-1 PR 2 量体形成に重要とされるアミノ酸の詳細な解析を進める。本計画で得られると思われるデータは、臨床試験段階にある阻害薬の研究成果に耐性発現機序に関わる基礎研究の成果を付与することなどが期待でき、阻害剤の基本骨格のデザイン・再デザインや、HIV への酵素学的・ウイルス学的解析が強化・スピードアップされ、更に密な情報交換と人的交流を通じ新しい世代の PDI、INI の開発が強力に推進されると思われる。

前述のように、我々は IN/PR 多量体化機構の解明を通して新規の IN/PR 阻害剤をデザイン・合成していくが、満屋/Ghosh グループのこれ迄のトランレーショナルリサーチの成果と業績からしてその実現性は極めて高い。そのような新規阻害剤が開発・臨床応用されれば、HIV/AIDS の診療領域にもたらされるインパクトは日本と世界で極めて高いものとなるのは間違いない。

E. 結論

本研究では広いスペクトラムで強力な抗 HIV-1 活性を発揮する新規 PIs のデザイン・合成を進めた。また HIV の増殖、複製に必須とされる HIV PR

の2量体形成に注目し、2量体形成過程での新規の分子機構を結晶解析等によるタンパクの分子レベルでの解析に加え、PRモノマー間の相互作用をHIV PRとレポータータンパクの融合タンパクの発現系と解析系により検討、HIV PR 2量体形成阻害効果を有する一連の新規化合物 PDI_s を同定した。1剤で2つの作用機序を有する新規抗HIV剤への耐性発現の genetic barrier は極めて高く、薬剤耐性 HIV への新たな対応策と考えられる。今後は DRV 等の PDI_s の複数の DRV 耐性関連変異等を有した PR モノマーサブユニットへの結合部位、結合様式に与える影響をウイルス学的・分子構造的・結晶学的に解析、PR サブユニットによる2量体形成のダイナミクスおよび BiFC-based HIV expression assay により IN 多量体形成のダイナミクスを明らかにする予定である。

F. 研究発表

論文発表

- Ghosh, A.K., Martyr, C.D., Steffey, M., Wang, Y.-F., Agniswamy, J., Amano, M., Weber, I.T., and Mitsuya, H. (2011) Design of substituted bis-tetrahydrofuran (bis-THF)-derived potent HIV-1 protease inhibitors, protein-ligand X-ray structure, and convenient syntheses of bis-THF and substituted bis-THF ligands. *ACS Med Chem, lett*, 2: 298-302,
- Maeda, K., Das, D., and Mitsuya, H. (2011) Development of antiviral therapeutics for HIV-1 infection and AIDS. In: *HIV/AIDS in the Post-HAART Era: Manifestations, Treatment & Epidemiology* (Ed.; Hall, J.C., Hall, B.J., and Cockerell, C.J.), People's Medical Publishing House – USA, Ltd., Shelton, CT. Chapter 40, p900-937.
- Ide K, Aoki M, Amano M, Koh Y, Yedidi RS, Das D, Leschenko S, Chapsal B, Ghosh AK, Mitsuya H. (2011) Novel HIV-1 Protease Inhibitors (PIs) Containing a Bicyclic P2 Functional Moiety, Tetrahydropyrano-Tetrahydrofuran, That Are Potent against Multi-PI-Resistant HIV-1 Variants. *Antimicrob Agents Chemother*. 55: 1717-1787.
- Ghosh AK, Chapsal BD, Baldrige A, Steffey MP, Walters DE, Koh Y, Amano M, Mitsuya H. (2011) Design and synthesis of potent HIV-1 protease inhibitors incorporating Hexahydrofurofuranol-derived high affinity P(2) ligands: structure-activity studies and biological evaluation. *J Med Chem*. 54(2): 622-634.
- Koh Y, Aoki M, Danish ML, Ogata AH, Amano M, Das D, Shafer RW, Ghosh AK, Mitsuya H. (2011) Loss of Protease Dimerization Inhibition Activity of Duronavir Is Associated with the Acquisition of Resistance to Darunavir by HIV-1. *J Virol*. 85: 10079- 10089.
- Ghosh AK, Chapsal BD, Parham GL, Steffey M, Agniswamy J, Wang YF, Amano M, Weber IT, Mitsuya H. (2011) Design of HIV-1 Protease Inhibitors with C3-Substituted Hexahydrocyclopentafuranyl Urethane as P2-Ligands: Synthesis, Biological Evaluations, and Protein- Ligand X-ray Crystal Structure. *J Med Chem*. 54: 5890-5901.

G. 知的所有権の出願・登録状況

1. 特許取得

- (1) The Name of the Patent: Fitness assay and associated methods

Date of Issuance: December 30, 2008

US Patent Number: 7,470,506

Erickson; John W. (Frederick, MD), Gulnik; Sergei V. (Frederick, MD), Mitsuya; Hiroaki (Chevy Chase, MD), Ghosh; Arun K. (River Forest, IL)

Assignee: The United States of America as represented by the Department of Health and Human Services (Washington, DC) and Board of Trustees of the University of Illinois.

Appl. No.: 09/720,276

Filed: June 23, 1999

PCT Filed: June 23, 1999

PCT No.: PCT/US99/14119

371(c)(1),(2),(4) Date: March 07, 2001

PCT Pub. No.: WO99/67417

PCT Pub. Date: December 29, 1999

- (2) The Name of the Patent: 4'-C-substituted-2-haloadenosine derivative

Date of Issuance: March 4, 2008

US Patent Number: 7,339,053B

Satoru Kohgo, Kashima-gun (JP); Hiroshi Ohrui, Sendai (JP); Eiichi Kodama, Kyoto (JP); Masao Matsuoka, Otsu (JP); Hiroaki Mitsuya, Kumamoto (JP)

Assignee: Yamasa Corporation, Chiba (JP)

Appl. No.: 11/087,588

Filed: March 24, 2005

2. 実用新案登録

該当なし

増殖型ベクター rBCG とワクチニア m8Δ による抗 SIV 免疫誘導と発症防止

所属 北海道大学遺伝子病制御研究所
研究代表者 志田壽利
研究期間 平成21年4月～平成24年3月

研究要旨 インド産赤毛猿で SIVmac 251 の感染防御に成功し、感染を許した場合でも体内ウイルス量を低く抑える組換え BCG-SIV プライム/組換えワクチニア m8Δ-SIV ブーストのワクチネーション法を開発した。

研究分担者

- (1) 国立感染症研究所エイズ研究センター
山本直樹
- (2) 日本 BCG 研究所 松尾和浩
- (3) 京都大学ウイルス研究所 五十嵐樹彦
- (4) ハーバード大学ニューイングランド
霊長類センター Welkin Johnson
- (5) 北海道大学遺伝子病制御研究所
大橋貴
- (6) 北海道大学遺伝子病制御研究所
張險峰

A. 研究目的

ヒトでの臨床試験と SIV-猿のモデル実験の結果、有効な HIV ワクチンは格段に強い免疫を誘導し、エフェクターメモリーT細胞(Tem)を維持することが必要であると考えられるようになった。そのために、増殖能を有することから強力な免疫を誘導できるが、まだ安全なワクチニア LC16m8Δ株と BCG は有力なベクターである。さらに、BCG は体内に長期間潜伏し、免疫を刺激し続けるために Tem の維持が期待できる。また、以前に SIV gag を発現する m8ΔSIVgag と非増殖型ワクチニア株 DIs 株と抗 Gag CTL 誘導能をマウスで比較したところ、m8Δによるより効率的な IFN-g 誘導 T 細胞の誘導を観察した。そこで、BCG と m8Δベクターワクチンを組み合わせて、赤毛猿において SIV 感染を制御出来る免疫法を開発することを目的とする。また、さらに両ベクターの改良を試み、小動物で検定する。

そのために、本研究チームは組換え BCG 作成グループ(山本・松尾)、組換えワクチニア作成グループ(志田)、猿での感染実験グループ(五十嵐、Johnson)より構成されている。

B. 研究方法

SIV Env, Gag および RTN 発現 BCG 東京株の構築: SIVmac239 のプロウイルス全長を含むプラスミド pBRmac239 (Dr. Desrosiers より供与)を鋳型

として PCR 法で増幅した SIV env gp120 遺伝子を、BCG の hsp60 promoter および terminator を含む pUC-hspK プラスミドにクローニングした。得られた組換えプラスミドより gp120 および RT 発現カセットを切り出し、抗酸菌一大腸菌シャトルプラスミド pSO246 にクローニングして、発現ベクター pSO-SIV gp120 および pSO-SIV RT を得た。一方、SIVmac 由来 Rev-tat-nef (RTN)融合遺伝子を含む pTK-RTN プラスミド (Dr. Knipe より供与) から、発現カセットを pSO246 にクローニングして、pSO-SIV RevTatNef を得た。また、コドン最適化 SIV gag については既に構築した pSO246-SIVgag-opt を用いた。ついで、電気穿孔法により BCG 東京株に導入し、rBCGgag-opt, rBCG-SIVgp120, rBCG-Rev-Tat-Nef を得た。また、ウレアーゼ欠損 BCG 東京株 (BCGDUT) (国立感染症研究所ハンセン病研究センターの向井徹博士より分与)も同様に組換え体を作製した。組換え m8Δの作製: pSFJ1-10 プロモーターを組み込んだワクチニアウイルス m8ΔVNC110 株のゲノム DNA を抽出し、MCS を切断する制限酵素で消化して、pSIVmac239 を鋳型に PCR で増やした RT/IN と env 領域、または RTN 遺伝子と in vitro で ligation した。ついで、Canary pox 感染 BHK 細胞に transfect して、ウイルスを収穫した。SIV 感染猿の血清と反応するウイルスを m8ΔSIVRT/IN または m8ΔSIVEnv 株とした。また、抗 Nef mAb に反応するウイルスを m8ΔRTN 株とした。

また、p7.5 と pEP10 プロモーターのもとで gag 遺伝子を発現する m8Δ組換え体を作製するために、pVR1 (p7.5 プロモーター含有プラスミド)の multiple cloning site に SIVgag 遺伝子を挿入した pVR1gag と、pBHAEP10 の multiple cloning site に SIVgag 遺伝子を挿入した pBHAEP10gag を作製した。ついで、Canary pox 感染 BHK 細胞に m8Δ ゲノム DNA と一緒に cotransfect して、1日後にウイルスを収穫した。

赤毛猿へのワクチネーションと SIV 感染 :

SIV 抵抗性 MHC 遺伝子 *Mamu-A*01, 02, 08, 11, B*01, 03, 04, 08, 17* を欠くインド産赤毛猿を選抜して用いた。なお、Trim5 α の遺伝子型を大阪大学微生物病研究所中山英美先生に依頼して調べていただいた。MM547(*TRIM5^{TFP/TFP}*), 549(*TRIM5^{TFP/TFP}*) をワクチン接種用に 551(*TRIM5^{TFP/TFP}*), 555(*TRIM5^{TFP/CypA}*) を対照として使用した。

それぞれ 0.5mg の rBCGSIVgag-opt, rBCG-SIVgp120, rBCG- Rev-Tat-Nef を皮下接種し、8 週後にそれぞれ 1×10^7 PFU の m8 Δ SIVgag, m8 Δ SIVenv, m8 Δ SIV RT/IN, m8 Δ SIVRTN を乱刺法で接種した。さらに 8 週後に組換えワクシニアで再度 boost し、8 週後に 300TCID₅₀ の SIVmac251 を繰り返し経直腸感染させた。

抗 SIV 多機能性 T 細胞の誘導と Tem を FACS (ICS 法) を用いて測定した。PBMC から分離した CD8+ T 細胞による SIV 増殖抑制活性を、SIV 感染 CD4+ T 細胞と混合培養して培養上清中の RT 活性の減少を指標として測定した。抗 Env/中和抗体を ELISA と CEMx174 レポーター細胞を用いて測定した。血中ウイルス量を定量 PCR で定量することにより感染の有無を調べた。

(倫理面への配慮)

感染動物実験は、北海道大学遺伝子病制御研究所と京都大学ウイルス研究所動物実験委員会による承認を受けた。承認内容を遵守して動物愛護上の配慮、生命倫理・安全対策を十分に考慮した上で実行した。

C. 研究結果

BCG プライム/ワクシニアブースト regime における m8 Δ の免疫原性 :

rBCG プライム/rVV ブーストのスケジュールにおいて m8 Δ SIVgag と DIsIVgag の細胞性免疫誘導能をマウスで比較した。DNA プライムの場合と同様 m8 Δ SIVgag の方が効率よく IFN- γ + T 細胞を誘導した。M8 Δ , DIs 共に Gag 特異的 IFN- γ + CD4+ T 細胞を CD8+ T 細胞よりも優位に誘導した。この現象は他のワクシニアワクチン (例えば NYVAC の臨床試験) でも報告されている。

種々のプロモーター (前期後期ともに高発現 pSFJ10、前期後期ともに中発現 p7.5、前期のみ高発現 pEP10) のもとで SIV gag 遺伝子を発現する組換え m8 Δ を作製して、Gag 発現 BCG とのプライムブースト法における至適 VV を調べた。その結果、m8 Δ SFJ10gag > m8 Δ 7.5gag > m8 Δ EP10gag の順に IFN- γ +, CD107a+, CD8+ T 細胞が誘導された。

SIV Env, RTN 融合蛋白質の BCG での発現 :

pSO-SIV gp120, pSO-SIV Gag および pSO-SIV RevTatNef をそれぞれ導入した BCG 東京株の菌体を Western blotting で解析したところ、gp120 およ

び RTN 遺伝子を組み込んだクローンでは特異的なバンドが認められ、コドン至適化 Gag 発現クローンは以前の物より約 10 倍の発現が見られた。SIV Env, RTN, RTN 融合蛋白質の m8 Δ での発現 : m8 Δ SIVRT/IN, m8 Δ SIVEnv, m8 Δ RTN, m8 Δ SIVGag を 293T 細胞に感染させて、各種 SIV タンパク質の発現を Western blotting で調べたところ、Gag, RT/IN, RTN, gp160/120 と gp41 のバンドが期待される分子量のところに検出された。

免疫猿の状態 :

rBCG 接種後、接種箇所には腫脹が認められた。rm8 Δ 接種 2 週後には乱刺箇所には痂皮の形成を認めた。局所的な皮膚反応を除いては動物の一般状態に異状はなく、安全性の点で大きな問題は認められていない。

免疫猿の多機能性 T 細胞の分析 :

免疫前、rBCG 接種 4 週後、rm8 Δ 初回ブースト 2 週と 4 週後、m8 Δ 2 回目ブースト 2 週と 4 週後、攻撃接種直前に猿の PBMC を調製し、Gag または Rev/Tat/Nef に反応して IFN- γ と TNF- α を分泌する multifunctional CD4+ T 細胞と CD8+ T 細胞の割合を ICS 法によって調べた。rBCG 接種 4 週後の免疫猿 (MM547, MM549) のうち、MM549 は低いながらも Gag と Rev/Tat/Nef の両方に反応する multifunctional CD4 と CD8 T 細胞を有していた。この T 細胞は m8 Δ SIV でブーストすることにより増強された。そして、攻撃接種直前まで維持された。もう一方の MM547 は rBCG 接種 4 週後には有意な SIV 反応性の multifunctional T 細胞を有していなかった。しかし、m8 Δ SIV でブースト後に Gag と Rev/Tat/Nef に反応する multifunctional CD4+ T 細胞を示した。非免疫猿 (MM551, MM555) は当然ながら、これらの T 細胞を誘導しなかった。

BCG は体内に潜伏して免疫刺激を続けるために、multifunctional T 細胞がエフェクターメモリー T 細胞 (Tem) として維持されることが期待された。そこで、Tem として維持されているかどうかを調べるために CCR7 と CD28 の発現状態を調べた。その結果、攻撃接種直前まで、Tem として維持されていることが分かった。

In vitro SIV suppressive 活性 :

現在のところ、SIV の感染制御と関連する唯一の免疫パラメーターは CD8+ T 細胞の in vitro における SIV の増殖阻害活性のみである。そこで、m8 Δ SIV ブースト 2 週と 4 週後にその活性を測定した。MM549 は強い SIV 増殖抑制活性を有していた。MM547 は弱い活性を有していた。

抗 SIV 抗体 :

ELISA 法で測定したところ、弱い SIV gp140 への結合抗体が両猿ともに同程度に誘導されていた。しかし、SIVmac239 に対する中和抗体は検出されなかった。

ワクチンの感染防御能：

SIVmac251 を経直腸感染させたところ、非免疫猿は2回目の接種で感染し、以降高い血中ウイルス量を示した。一方、効果的な抗 SIV 免疫を誘導した MM 549 では5回の接種後も半年間の観察期間中1度もウイルスが検出されなかった。CD8+ T 細胞を枯渇させるために抗 CD8 抗体 (M-T807R1) を注入しても MM549 から SIV は検出されなかった。また、SIV チャレンジ後 MM549 の抗 Env 抗体価は変化しなかったが、非免疫猿と MM547 には大幅な増加が認められた。感染防御を最終的に確認するために、実験終了時に猿の各種臓器とリンパ節を採取してプロウイルス量を測定した。MM549 においてはいずれの臓器でもプロウイルスは検出されなかった。他方、MM547 では各種リンパ組織にプロウイルスが確認された。これらのことから、MM549 は感染防御されたと考える。免疫誘導の弱かった MM547 には3回目の SIV 接種で感染したが、体内ウイルス量は低く抑えられて発症の遅延が期待される。

猿感染実験の拡大について：

上記は猿4頭を使用しての結果で、より多数の猿で確認しなければならない。米国ニューイングランド primate center で昨年大きなトラブルが発生したために、大幅に実験が遅れていたが、平成24年1月から猿5頭（非免疫猿5頭）へのワクチネーションが始まった。その結果を期待したい。

SIV Gag 発現ウレアーゼ欠損 BCG 株によるマウスでの免疫原性評価：

C57BL/6マウスにrBCG-SIVgag-optとrBCGDUT-SIVgag-optおよびコントロールとしてBCG親株を皮下接種し、2週後の脾細胞を用いたELISPOTの結果を図5に示す。予備的な結果であるが、0.3 mgおよび0.5 mgの用量で、ウレアーゼ欠損株を用いた方が、SIV Gag p27特異的IFN-g産生細胞が増加する傾向が認められた。

D. 考察

今年度、コドン至適化 Gag, Env, Rev-Tat-Nef を発現する rBCG でプライムし、Gag, Env, RT/IN, Rev-Tat-Nef を発現する rm8Δ でブーストしたところ、2頭のうち1頭のインド産赤毛猿に強い抗 SIV T 細胞免疫を誘導することに成功した。そして、その1頭で SIVmac251 の感染防御に成功した。また、他の1頭も体内ウイルス量を低く抑え、発症の遅延が期待される。SIVmac251 は高度抗体耐性でありかつ抗原多様性を持つウイルス群のためにもっとも感染防御が難しいとされている。実際、DNA プライム/アデノウイルスベクターブーストの免疫法では感染防御も体内ウイルス量を下げることができなかった。従って、

本免疫法は抗 HIV-1 ワクチンとして発展させることができると考える。感染防御に働いた免疫は、抗体では無く、*in vitro* で SIV 抑制活性を有する CD8+ T 細胞と考えられる。Tem として維持されていたことにより、侵入部位で素早く SIV を排除することができたと思われる。人への接種可能なベクターを用いて SIV 感染を防御した本結果は世界初の快挙であり、HIV-1 感染防御ワクチン開発への弾みとなる。

しかし、米国 primate center で起ったトラブルのために大幅に実験が遅れ、日本で行われた少数の猿での結果にとどまる。Dr. Johnson はこの事態に深く責任を感じ、本研究期間終了後も彼自身のグラントを投入して猿10頭を用いた実験を完遂することを約束している。

E. 結論

赤毛猿をコドン至適化 Gag, Env, Rev-Tat-Nef 発現 rBCG でプライムし、Gag, Env, RT/IN, Rev-Tat-Nef 発現 rm8Δ でブーストすることより、インド産赤毛猿2頭のうち1頭で SIVmac 251 の感染防御に成功し、他の1頭も体内ウイルス量を低く抑えた。

F. 研究発表

1. 論文発表 論文発表

1. Hajime Suzuki, Ismael Ben Fofana, Kazuhiro Matsuo, Naoki Yamamoto, Hisatoshi Shida et al. (2009): Immunogenicity of newly constructed attenuated vaccinia strain LC16m8Δ that expresses SIV Gag protein. *Vaccine* 27:966-971
2. Kubo, M., Nishimura, Y., Shingai, M., Lee, W., Brenchley, J., Lafont, B., Buckler-White, A., Igarashi, T., and Martin, M.A. Initiation of antiretroviral therapy 48 hours after infection with simian immunodeficiency virus potently suppresses acute-phase viremia and blocks the massive loss of memory CD4+ T cells but fails to prevent disease. *J. Virol.* 83: 7099-7108, 2009.
3. Kirmaier, A., Wu, F., Newman, R.M., Hall, L.R., Morgan, J., O'Connor, S., Marx, P.A., Meythaler, M., Goldstein, S., Buckler-White, A., et al. 2010. TRIM5 Suppresses Cross-Species Transmission of a Primate Immunodeficiency Virus and Selects for Emergence of Resistant Variants in the New Species. *PLoS Biol* 8:e1000462
4. Yoshino N, Kanekiyo M, Hagiwara Y, Okamura T, Someya K, Matsuo K, Ami Y, Sato S, Yamamoto N, Honda M. Intradermal delivery of recombinant vaccinia virus vector DIs induces gut-mucosal immunity. *Scand. J. Immunol.* 72: 98-105 (2010)
5. Matsuo K, Yamamoto N. Paradigm change in immune correlation: cellular or humoral? *Expert Rev. Vaccines* 9: 985-987 (2010)
6. Himeno, A., Akagi, T., Uto, T., Wang, X., Baba,

- M., Ibuki, K., Matsuyama, M., Horiike, M., Igarashi, T., Miura, T. and Akashi, M. Evaluation of the immune response and protective effects of rhesus macaques vaccinated with biodegradable nanoparticles carrying gp120 of human immunodeficiency virus. *Vaccine*. 28:5377-85, 2010.
7. Fofana IB, Shida H, Johnson WE et al. (2011) Flow cytometry based identification of simian immunodeficiency virus Env-specific B lymphocytes. *J Immunol Methods*. 370:75-85
8. Matsuo K, and Yasutomi Y. *Mycobacterium bovis* bacilli Calmette-Guerin vector for global infectious disease control. *Tuberculosis Research and Treatment 2011*: Article ID 574591, 2011
9. Matsuo K and Ami Y. BCG as a vector for HIV/AIDS vaccine. *BCG Vaccine and Adjuvant*, pp124-141. Edited by T. Takii, J. Maeyama and S. Yamamoto. Japan Anti-Tuberculosis Association, 2011
10. Horiike, M., Iwami, S., Kodama, M., Sato, A., Watanabe, Y., Yasui, M., Ishida, Y., Kobayashi, T., Miura, T., and Igarashi T. Lymph nodes harbor viral reservoirs that cause rebound of plasma viremia in SIV-infected macaques upon cessation of combined antiretroviral therapy. *Virology*. 423:107-18, 2012.
2. 学会発表
1. 松田健太、稲葉一寿、深澤嘉伯、伊吹謙太郎、松山めぐみ、堀池麻里子、速水正憲、五十嵐樹彦、三浦智行：抗 HIV ワクチン評価に有用な R5 指向性 SHIV の作製、第 57 回日本ウイルス学会学術集会、2009 年 10 月 25-27 日、東京
2. 祖父江友芳、大橋貴、志田壽利：抗 Env 免疫誘導に対する CD40Lm の効果 第 24 回日本エイズ第学会学術総会 平成 22 年 1 月 1 日 グランドプリンスホテル 東京
3. Matsubara A, Watanabe K, Kawano M, Mizuno S, Tsujimura Y, Inada H, Fukumura M, Nosaka T, Matsuo K, Yasutomi Y. Intranasal immunization with replication-deficient recombinant human parainfluenza type 2 virus-Ag85B showed protective effects against *Mycobacterium tuberculosis* infection. The Second Global TB Vaccine Forum, Tallin,
4. 中村仁美、五十嵐樹彦、三浦智行：相同組換えによって作製した新規サル／ヒト免疫不全ウイルスの遺伝子解析、第 19 回サル疾病ワークショップ、2010 年 7 月 3 日、東京
5. S. Iwami, M. Horiike, T. Miura and T. Igarashi: Contribution of Long-Lived Productively Infected Cells in SIV Infection. SIAM Conference on Life Science, Pittsburgh, Pennsylvania, July 12-15, 2010
6. 張 陰峰、松尾 和浩、三浦 智行、五十嵐 樹彦、山本直樹、大橋 貴、志田 壽利 他：高病原性 SIV に対する組み換え BCG と弱毒ワクシニア(m8Δ)エイズワクチンの防御効果 第 25 回日本エイズ第学会学術総会 平成 22 年 1 月ハイアットリージェンシー東京 東京
7. Invited Speaker, Symposium on The Evolution of Infectious Agents in Relation to Sex, Bjorkborn, Karlskoga, Sweden. October 21-23, 2010
8. Tomoyoshi Sobue, Xianfeng Zhang, Takashi Ohashi, Hisatoshi Shida et al. (2011) Immunogenicity of LC16m8Δ vaccinia prime/Sendai virus vector boost targeting the envelope glycoprotein of HIV-1 and contribution of CD40Lm. IUMS 2011, Sapporo, Japan (2011)
9. Xianfeng Zhang, Tomoyoshi Sobue, Hisatoshi Shida: Enhancement of CD40Lm on Vaccine Elicited Anti-HIV-1 Immunity. July 2011, 6th IAS Conference on HIV Pathogenesis, Treatment and Prevention. Rome, Italy.
10. H. Shida: Immunogenicity of LC16m8Δ Vaccinia Virus/Sendai Virus Vector Expressing the gp160 of HIV-1 and Effect of CD40Lm AIDS VACCINE 2011 September 2011 Bangkok Thailand
- G. 知的所有権の出願・登録状況
1. 特許取得：志田壽利 他「高度安全性痘瘡ワクチンウイルスおよびワクシニアウイルスベクター」出願番号 2005-511272
2. 特許出願：志田壽利 他「ワクシニアウイルスベクターおよびセンダイウイルスベクターからなるプライム／ブーストワクチン用ウイルスベクター」出願番号：特願2010-237954号
3. 特許出願：松尾和浩 他「新規な組換え BCG ワクチン」特願 2011-199422 出願人：(独)医薬基盤研究所、日本ビーシージー製造(株)

増殖型ベクター rBCG とワクチニア m8Δ による抗 SIV 免疫誘導と発症防止

北海道大学遺伝子病制御研究所
志田壽利

研究要旨 インド産赤毛猿をコドン最適化 Gag, Env, Rev-Tat-Nef 発現 rBCG でプライムし、Gag, Env, RT/IN, Rev-Tat-Nef 発現 rm8Δ でブーストすることにより、インド産赤毛猿 2 頭のうち 1 頭で SIVmac 251 の感染防御に成功し、他の 1 頭も体内ウイルス量を低く抑えた。より免疫原性の高い BCG ベクターの開発に成功した。また、種々のプロモーターを比較することにより、一番免疫誘導能の高いワクチニア m8Δ リコンビナントの作製法を同定した。

研究分担者

- (1) 日本 BCG 研究所 松尾和浩
- (2) 京都大学ウイルス研究所 五十嵐樹彦
- (3) ハーバード大学ニューイングランド霊長類センター Welkin Johnson
- (4) 北海道大学遺伝子病制御研究所 張隄峰

A 研究目的

HIV-1 に対する有効なワクチンを開発するためには格段に強い免疫を誘導することが必要である。そのために、増殖するがまだ安全なワクチニアウイルス LC16m8Δ株と BCG は有力なベクターである。昨年度、コドン最適化 Gag, Env, Rev-Tat-Nef 発現 BCG でプライムし、Gag, Env, RT/IN, Rev-Tat-Nef 発現 m8Δでブーストすることにより、強い抗 SIV 免疫を誘導することに成功した。特に *in vitro* での SIV 抑制活性は強かった。そこで、今年度はこの猿の免疫状態をさらに追跡するとともに、SIVmac251 を攻撃接種して感染防御がなるかどうか調べることを目的とする。また、さらに、ワクチン効果を高めるために、BCG と m8Δベクターの改良を行う。

B 研究方法

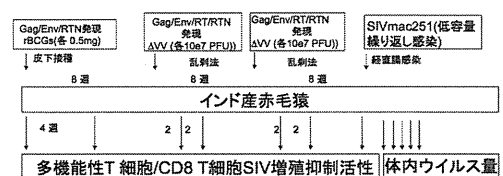
SIV 遺伝子発現 rBCG:組換え BCG(rBCGgag-opt, rBCG-SIVgp120, rBCG-Rev-Tat-Nef)を用いた。

SIV 遺伝子発現ワクチニア m8Δ:組換え m8Δ株 (m8ΔSFJ10SIVgag, m8ΔSIVenv, m8ΔSIVRT/IN, m8ΔSIVRTN)を用いた。

赤毛猿へのワクチネーション: 図 1 に示すようにそれぞれ 0.5mg の rBCGSIVgag-opt, rBCG-SIVgp120, rBCG-Rev-Tat-Nef を皮下接種し、8 週後にそれぞれ 1×10^7 PFU の m8ΔSIVgag, m8ΔSIVenv, m8ΔSIV RT/IN, m8ΔSIVRTN を乱剃法で接種した。さらに 8 週後に同じ m8Δ-SIV で追加免疫した。

Intracellular cytokine assay (ICS):免疫猿の抹消血リンパ球(PBMC)を gag または rv/tat/nef

図1 ワクチネーションスケジュール



overlapping peptide library とともに培養し、抗 CD4/CD8/IFN- γ 等各種抗体で標識後 FACSanto を用いて分析した。

抗 SIV 抗体の測定: SIV gp140 をコートした ELISA と CEMx174 レポーター細胞を用いた中和アッセイ法を行った。

SIV の攻撃接種と体内ウイルス量の測定:

最終免疫 8 週後低用量 (300TCID₅₀) の SIVmac251 を直腸経路で 1 週間毎に繰り返し攻撃接種した。血中ウイルス量を定量 PCR で測定した。攻撃接種約半年後の実験終了時に各種臓器とリンパ節を採取し、プロウイルス DNA を定量 PCR で測定した。なお、免疫、ウイルス接種及び採血はケタミン (5-10 mg/kg) /キシラジン (0.25-2 mg/kg) 麻酔下で行った。

(倫理面への配慮)

動物の飼養及び動物実験は、「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」に基づいた「京都大学における動物実験の実施に関する規定」及び「動物の愛護及び管理に関する法律」に則り遂行した。実験開始に先立ち、本研究課題に関連する実験計画についてウイルス研究所の「霊長類委員会」で承認を得た。京都大学ウイルス研究所附属 P3 霊長類施設におけるアカゲザルの飼養については、「特定外来生物による生態系等に係わる被害の防止に関する法律」(平成 16 年法律第 78 号) 第 5 条の規定に基づき、環境大臣より許可を受けている(許可番号 05000112)。

また、「感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律」第54条第1号の輸入禁止地域等を定める省令（平成11年厚生省・農林水産省令第2号）に基づき輸入サル飼育施設の指定を受けている（指定番号19-009）。

ウレアーゼ (ureC 遺伝子) 欠損型 BCG 東京株でのコドン至適化 SIV gag 遺伝子の発現:

ウレアーゼ欠損 BCG 東京株 (BCGDUT) は、国立感染症研究所ハンセン病研究センターの向井徹博士より分与いただいた [Mukai et al., FEMS Immunol. Med. Microbiol., 53(1), 96-106 (2008)]. 既に報告したコドン至適化 SIV Gag 発現ベクターを BCGDUT に電気穿孔法で導入し、カナマイシン耐性コロニーから調製した菌体抽出液を用いてウエスタンブロット解析を行ない、SIV Gag 発現株を得た (rBCGDUT-SIVgag-opt)。組換え m8Δ の作製:

pVR1 (p7.5 プロモーター含有プラズミド) の multiple cloning site に SIVgag 遺伝子を挿入した pVR1gag を作製した。pBHAEP10 の multiple cloning site に SIVgag 遺伝子を挿入した pBHAEP10gag を作製した。ついで、Canary pox 感染 BHK 細胞に m8Δ ゲノム DNA と一緒に cotransfect して、1日後にウイルスを収穫した。子孫ウイルスのプラーク中の血球凝集素マイナス (HA-) のものを選んでウイルスを回収した。SIV 感染猿の血清を用いた Western blotting で p55 のバンドを示すウイルスを m8Δ EP10 又は m8Δ 7.5gag とした。

C 研究成果

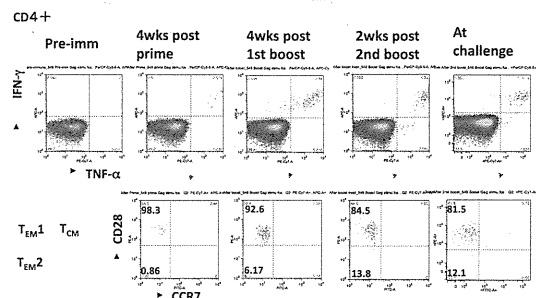
ICS による multifunctional T 細胞の分析:

免疫前, rBCG 接種4週後, rm8Δ初回ブースト2週と4週後, m8Δ2回目ブースト2週と4週後, 攻撃接種直前に猿の PBMC を調製し, Gag または Rev/Tat/Nef に反応して IFN-γ と TNF-α を分泌する multifunctional CD4+ T 細胞と CD8+T 細胞の割合を ICS 法によって調べた。rBCG 接種4週後の免疫猿(MM547, MM549)のうち, MM549 は低いながらも Gag と Rev/Tat/Nef の両方に反応する multifunctional CD4 と CD8T 細胞を有していた。この T 細胞は m8ΔSIV でブーストすることにより増強された。そして, 攻撃接種直前まで維持された。もう一方の MM547 は rBCG 接種4週後には有意な SIV 反応性の multifunctional T 細胞を有していなかった。しかし, m8ΔSIV でブースト後に Gag と Rev/Tat/Nef に反応する multifunctional CD4+T 細胞を示した。非免疫猿(MM551, MM555)は当然ながら, これらの T 細胞を誘導しなかった。

BCG は体内に潜伏して免疫刺激を続けるため

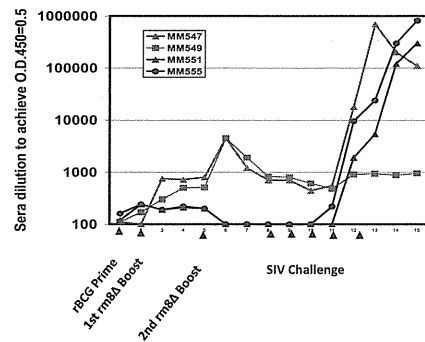
に, multifunctional T 細胞がエフェクターメモリーT細胞(Tem)として維持されることが期待された。そこで, Tem として維持されているかどうかを調べるために CCR7 と CD28 の発現状態を調べた。その結果, 攻撃接種直前まで, Tem として維持されていることが分った。その典型的なパターンを図2に示す。

図2 誘導された多機能性T細胞はTemのphenotypeを維持した。



抗 SIV 抗体の分析: 抗 gp140 結合抗体は rBCG-SIVgp120 プライムでは誘導されなかったが, m8Δenv ブーストで誘導され, m8Δenv 2 階目のブーストで増強された。MM547 と MM549 の間では差がなかった。SIV 攻撃接種後 MM547 では急激に抗体価が上昇したが, MM549 においてはわずかの上昇にとどまった(図3)。また, SIVmac239 に対する中和抗体は誘導されていなかった。

図3 rBCG-rm8Δワクチンは抗Env抗体を誘導したが, 中和抗体を誘導しなかった。

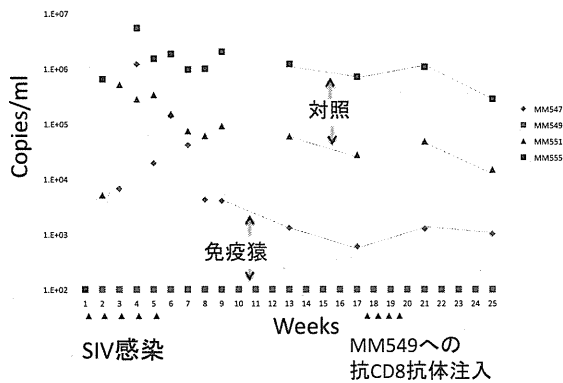


攻撃接種後の体内ウイルス量:

免疫8週後, SIVmac251 を低用量繰り返し接種により直腸感染させて, 感染防御能を調べた。SIV251 は中和抗体高度耐性で抗原多様性を持つウイルス群のために最も感染防御が難しいとされている。その結果, 強い抗 SIV T 細胞免疫を誘導したアカゲザル MM549 は5回の攻撃接種後でも SIV が全く検出されなかった。MM549 が完全に感染防御されたかどうかを調べるために抗 CD8 抗体を移入して CD8+T 細胞を枯渇させて

も、SIV は検出されなかった。一方、比較的免疫応答の弱かったアカゲザル MM547 では、3 回目の攻撃接種後に SIV が検出されたが、ウイルス量を低く抑え、発症の遅延が期待された。これに対して対照のアカゲザル 2 頭では 2 回目の攻撃接種後 SIV が検出され、高い血漿中ウイルス量が維持された。

図4 SIV攻撃接種後の体内ウイルス量



そこで、感染防御を最終的に確認するために、実験終了時に猿の各種臓器とリンパ節を採取してプロウイルス量を測定した。MM549 においてはいずれの臓器でもプロウイルスは検出されなかった。他方、MM547 では各種リンパ組織にプロウイルスが確認された。このことは MM549 が感染防御されたことを示している。

猿感染実験の拡大について：

上記は猿 4 頭を使用しての結果で、より多数の猿で確認しなければならない。米国ニューイングランド primate center で昨年大きなトラブルが発生したために、大幅に実験が遅れていたが、平成 24 年 1 月から猿 5 頭（非免疫猿 5 頭）へのワクチネーションが始まった。その結果を期待したい。

SIV Gag 発現ウレアーゼ欠損 BCG 株によるマウスでの免疫原性評価：

C57BL/6 マウスに rBCG-SIVgag-opt と rBCGDUT-SIVgag-opt およびコントロールとして BCG 親株を皮下接種し、2 週後の脾細胞を用いた ELISPOT の結果を図 5 に示す。予備的な結果であるが、0.3 mg および 0.5 mg の用量で、ウレアーゼ欠損株を用いた方が、SIV Gag p27 特異的 IFN-g 産生細胞が増加する傾向が認められた。

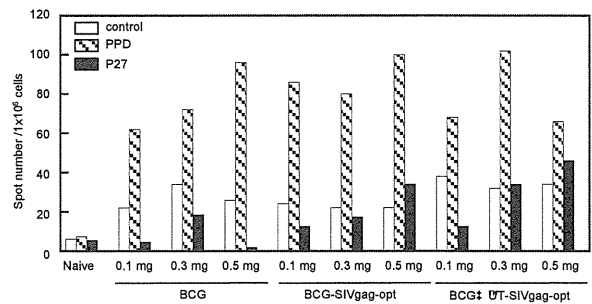


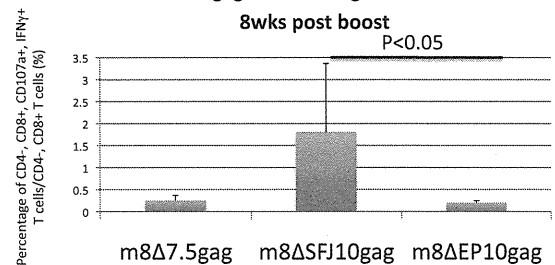
図5 免疫マウス脾細胞における SIV Gag 特異的 IFN- γ 産生細胞の解析

SIV 遺伝子を発現する種々の m8 Δ 株の細胞性免疫誘導能：

従来、高発現のプロモーターの下で抗原遺伝子を発現させれば強い免疫が惹起されると考えられてきた。しかし、最近の我々の観察によると、外来タンパク質のあまりの高発現は VV の増殖を阻害する。従って、発現量と免疫誘導能が一致するとは限らない。また、細胞性免疫の誘導に有効な抗原は VV 感染の前期発現タンパク質であると従来主張されて来た。そこで、種々のプロモーター（前期後期ともに高発現 pSFJ10、前期後期ともに中発現 p7.5、前期のみ高発現 pEP10）のもとに SIV gag 遺伝子を発現する組換え m8 Δ を作製して、Gag 発現 BCG との prime boost 法における至適 VV を調べた。

各種 m8 Δ ブースト 2 又は 8 週後に脾臓細胞を調製して Gag peptide で刺激後 ICS を測定した。図 6 に示すように m8 Δ SFJ10gag > m8 Δ 7.5gag > m8 Δ EP10gag の順に IFN- γ +, CD107a+, CD8+ T 細胞が誘導された。m8 Δ SFJ10gag 免疫マウスと m8 Δ EP10gag 免疫マウスとの間には有意差が見られた。

図6 各種 m8 Δ gag による抗 Gag CD8+T 細胞の誘導



D 考察

今年度、コドン至適化 Gag, Env, Rev-Tat-Nef を発現する rBCG でプライムし、Gag, Env, RT/IN, Rev-Tat-Nef を発現する rm8 Δ でブーストしたところ、2 頭のうち 1 頭のインド産赤毛猿に強い抗 SIV T 細胞免疫を誘導することに成功した。そし

て、その1頭で SIVmac251 の感染防御に成功した。また、他の1頭も体内ウイルス量を低く抑え、発症の遅延が期待される。SIVmac251 は高度抗体耐性でありかつ抗原多様性を持つウイルス群のためにもっとも感染防御が難しいとされている。実際、DNA prime/アデノウイルスベクター boost の免疫法では感染防御も体内ウイルス量を下げることができなかった。従って、本免疫法は抗 HIV-1 ワクチンとして発展させることができると考える。感染防御に働いた免疫は、抗体では無く、*in vitro* で SIV 抑制活性を有する CD8+ T 細胞と考えられる。Tem として維持されていたことにより、侵入部位で素早く SIV を排除することができたと思われる。

E 結論

赤毛猿をコドン至適化 Gag, Env, Rev-Tat-Nef 発現 rBCG でプライムし、Gag, Env, RT/IN, Rev-Tat-Nef 発現 rm8Δ でブーストすることより、インド産赤毛猿2頭のうち1頭で SIVmac 251 の感染防御に成功し、他の1頭も体内ウイルス量を低く抑えた。

F 研究発表

1. 論文発表

- (1) Morita, D., Igarashi, T., Horiike, M., Mori, N., and Sugita, M. T cells monitor N-myristoylation of the nef protein in simian immunodeficiency virus-infected monkeys. *J. Immunol.* 187:608-12, 2011.
- (2) Takahara, Y., Matsuoka, S., Kuwano, T., Tsukamoto, T., Yamamoto, H., Ishii, H., Nakasone, T., Takeda, A., Inoue, M., Iida, A., Hara, H., Shu, T., Hasegawa, M., Sakawaki, H., Horiike, M., Miura, T., Igarashi, T., Naruse, T.K., Kimura, A., and Matano, T. Dominant induction of vaccine antigen-specific cytotoxic T lymphocyte responses after simian immunodeficiency virus challenge. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 408:615-9, 2011.
- (3) Kuwata, T., Katsumata, Y., Takaki, K., Miura, T., and Igarashi, T. Isolation of potent neutralizing monoclonal antibodies from an SIV-infected rhesus macaque by phage display. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 27(5): 487-500, 2011.
- (4) Nishimura, Y., Shingai, M., Lee, W. R., Sadjadpour, R., Donau, O. K., Willey, R., Brenchley, J. M., Iyengar, R., Buckler-White, A., Igarashi, T., and Martin, M. A. Recombination Mediated Changes in Coreceptor Usage Confers an Augmented Pathogenic Phenotype in a Non-human Primate Model of HIV-1 Induced AIDS. *J. Virol.* 85:10617-26, 2011.
- (5) Nakamura, M., Takahara, Y., Ishii, H., Sakawaki, H., Horiike, M., Miura, T., Igarashi, T., Naruse, T.K., Kimura, A., Matano, T., and Matsuoka, S. Major histocompatibility complex class I-restricted cytotoxic T lymphocyte responses during primary simian immunodeficiency virus infection in Burmese rhesus macaques. *Microbiol. Immunol.* 55:768-773, 2011.
- (6) Horiike, M., Iwami, S., Kodama, M., Sato, A., Watanabe, Y., Yasui, M., Ishida, Y., Kobayashi, T., Miura, T., and Igarashi, T. Lymph nodes harbor viral reservoirs that cause rebound of plasma viremia in SIV-infected macaques upon cessation of combined antiretroviral therapy. *Virology.* 423:107-18, 2012.
- (7) Matsuo, K., and Yasutomi Y. *Mycobacterium bovis* bacilli Calmette-Guerin vector for global infectious disease control. *Tuberculosis Research and Treatment* 2011: Article ID 574591, 2011
- (8) Matsuo, K. and Ami Y. BCG as a vector for HIV/AIDS vaccine. BCG Vaccine and Adjuvant, pp124-141. Edited by T. Takii, J. Maeyama and S. Yamamoto. Japan Anti-Tuberculosis Association, 2011
- (9) Fofana IB, Colantonio AD, Reeves RK, Connole MA, Gillis JM, Hall LR, Sato S, Audin CR, Evans DT, Shida, H., Johnson RP, Johnson WE (2011):Flow cytometry based identification of simian immunodeficiency virus Env-specific B lymphocytes. *J Immunol Methods.* 370:75-85
- (10) Mina Hikichi, Minoru Kidokoro, Takeshi Haraguchi, Hideo Iba, Hisatoshi Shida, Hideaki Tahara, Takafumi Nakamura (2011): MicroRNA Regulation of Glycoprotein B5R in Oncolytic Vaccinia Virus Reduces Viral Pathogenicity without Impairing its Antitumor Efficacy. *Mol. Ther.* 19:1107-15
- (11) Mika Nagai-Fukataki, Takashi Ohashi, Iwao Hashimoto, Tominori Kimura, Yoshiyuki Hakata, Hisatoshi Shida (2011): Nuclear and Cytoplasmic Effects of Human CRM1 on HIV-1 Production in Rat Cells. *Genes to Cells* 16:203-216.
- (12) Lakhshashe SK, Velu V, Sciaranghella G, Siddappa NB, Dipasquale JM, Hemashettar G, Yoon JK, Rasmussen RA, Yang F, Lee SJ, Montefiori DC, Novembre FJ, Villinger F, Amara RR, Kahn M, Hu SL, Li S, Li Z, Frankel FR, Robert-Guroff M, **Johnson WE**, Lieberman J, Ruprecht RM.2011. Prime-boost vaccination with heterologous live vectors encoding SIV gag and multimeric HIV-1 gp160 protein: Efficacy against repeated mucosal R5 clade C SHIV challenges. *Vaccine* [Epub ahead of print]
- (13) Schell JB, Rose NF, Bahl K, Diller K, Buonocore L, Hunter M, Marx PA, Gambhira R, Tang H, Montefiori DC, Johnson WE, Rose JK.2011. Significant Protection against High-Dose Simian Immunodeficiency Virus Challenge Conferred by a New Prime-Boost Vaccine Regimen. *J Virol.* Jun;85(12):5764-72.

- (14) Gokcumen, O.O., Babb, P.L., Iskow, R., Zhu, Q., Shi, X. Mills, R.E., Ionita-Laza, I., Vallender, E.J., Clark, A.G., **Johnson, W.E.**, Lee, C. 2011. Refinement of primate CNV hotspots identifies candidate genomic regions evolving under positive selection. *Genome Biology*.12(5):R52
- (15) Lai L, Kwa S, Kozlowski PA, Montefiori DC, Ferrari G, **Johnson WE**, Hirsch V, Villinger F, Chennareddi L, Earl PL, Moss B, Amara RR, Robinson HL. 2011. Prevention of Infection by a Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor Co-Expressing DNA/Modified Vaccinia Ankara Simian Immunodeficiency Virus Vaccine. *J Infect Dis*. 204(1):164-73.

2. 学会発表

1. 宮崎かや、張陰峰、大橋貴、志田壽利：ラット T 細胞への HIV-1 感染における CSA,As₂O₃ の増強効果 第 25 回日本エイズ学会学術総会 平成 23 年 11 月 ハイアットリージェンシー東京 東京
2. 張陰峰、五十嵐樹彦、松尾和浩、堀端重男、横溝香里、三浦智行、大橋貴、山本直樹、志田壽利：抗病原性 SIV に対する組換え BCG と弱毒ワクシニア(m8Δ)エイズワクチンの防御効果 第 25 回日本エイズ学会学術総会 平成 23 年 11 月 ハイアットリージェンシー東京 東京
3. H. Shida: Immunogenicity of LC16m8Δ Vaccinia Virus/Sendai Virus Vector Expressing the gp160 of HIV-1 and Effect of CD40Lm AIDS VCCINE 2011 September 2011 Bangkok Thailand
4. Tomoyoshi Sobue, Shun-Ichi Makino, Xianfeng Zhang, Takashi Ohashi, Kazunori Kato, Tatsuo Shioda, Nakoto Inoue, Mamoru Hasegawa, Hisatoshi Shida: Immunogenicity of Lc16M8Δ Vaccinia Prime/Sendai Virus Vector Boost Targeting the Envelope Glycoprotein of HIV-1 and Contribution of CD40Lm. September 2011, XV International Congress of Virology. Sapporo Convention Center, Sapporo, Japan.
5. Xianfeng Zhang, Tomoyoshi Sobue, Hisatoshi Shida: Enhancement of CD40Lm on Vaccine Elicited Anti-HIV-1 Immunity. July 2011, 6th IAS Conference on HIV Pathogenesis, Treatment and Prevention. Rome, Italy.
6. 中村碧、高原悠佑、阪脇廣美、堀池麻里子、三浦智行、五十嵐樹彦、成瀬妙子、木村彰方、侯野哲朗、松岡沙織 サルエイズモデル感染初期における MHC クラス I ハプロタイプ別の CTL 反応優位パターンの解析 第 25 回日本エイズ学会学術集会 11.30 東京
7. 森田大輔、五十嵐樹彦、堀池麻里子、森直樹、杉田昌彦 Nef 蛋白質のミリスチン酸修飾をモニターする新たな免疫システム 第 25 回日本エイズ学会学術集会 11.30 東京
8. 大附寛幸、三浦智行、小林剛、吉村和久、玉村啓和、松下修三、五十嵐樹彦 中和抵抗性

のサル/ヒト免疫不全ウイルスの作製と in vitro における立体構造変化誘導剤による中和感受性増強効果の評価 第 25 回日本エイズ学会学術集会 11.30 東京

9. Kanekiyo M, Ami Y, Matsuo K, Someya K, Yamamoto N, and Honda M. A low dose immunization of codon-optimized recombinant BCG confers long-lasting SIV-specific memory T cells after recombinant vaccinia boost in macaques. *AIDS Vaccine* 2011, September 12-15, 2011, Bangkok, Thailand
10. Okamura T, Shimizu Y, Matsuo K, and Yasutomi Y. Adjuvant molecule Ag85B cDNA insertion into live attenuated simian-human immunodeficiency virus enhances the SHIV-specific immune responses in cynomolgus monkeys. *IUMS* 2011, September 11-15, 2011, Sapporo, Japan

G 知的所有権の取得状況

無し

医薬品製剤及び製造工程の科学的開発戦略を実現させるための製剤評価及び製造工程評価法の開発研究

所属 国立医薬品食品衛生研究所
研究者 川西 徹
研究期間 平成22年4月～平成24年3月

研究要旨 科学的体系的アプローチによる医薬品製剤開発の実現に不可欠な製剤特性を解析するための適切な評価法が定まっていない(1)超難溶性薬物製剤, (2)機能性製剤, (3)ナノ粒子 DDS 製剤等について製剤特性評価法の開発を行い, また, (4)これらの製剤の製造工程をリアルタイム, 超高速に管理する製造工程管理手法を検討した。

分担研究者

- (1) 国立医薬品食品衛生研究所 阿曾幸男
- (2) 国立医薬品食品衛生研究所 宮崎玉樹
- (3) 千葉大学大学院薬学研究院 山本恵司
- (4) 塩野義製薬 村主教行
- (5) アステラス製薬 三村尚志
- (6) 第一三共 脇山尚樹
- (7) 武田薬品工業 池田幸弘
- (8) 国立医薬品食品衛生研究所 四方田千佳子
- (9) 国立医薬品食品衛生研究所 柴田寛子
- (10) 帝京大学薬学部 丸山一雄
- (11) アステラス製薬 山梨繁行
- (12) 大鵬薬品 木下真宏
- (13) 東和薬品 立木秀尚
- (14) ニプロパッチ 山内仁史
- (15) 富士フィルム 大野誠
- (15) 国立医薬品食品衛生研究所 加藤くみ子
- (16) 東京大学大学院薬学系研究科 楠原洋之
- (17) 東京大学大学院医学系研究科 西山伸宏
- (18) エーザイ株式会社 石原比呂之
- (19) 日本化薬株式会社 中西健
- (20) 国立医薬品食品衛生研究所 香取典子
- (21) 国立医薬品食品衛生研究所 小出達夫
- (22) 国立医薬品食品衛生研究所 坂本知昭
- (23) 国立医薬品食品衛生研究所 檜山行雄
- (24) 参天製薬(株) 西岡和幸
- (25) 塩野義製薬(株) 古家喜弘
- (26) 武田薬品工業(株) 小澤昭夫
- (27) 田辺三菱製薬(株) 田邊良輔
- (28) 日揮(株) 河合正雄
- (29) (株)パウレック 高嶋武志
- (30) 東邦大学 薬学部 寺田勝英

A. 研究目的

医薬品製剤開発・品質管理に製造科学と品質リスク管理の考えを導入し, 製造・品質管理を近代化する必要性が叫ばれ, ICH (日米 EU 医薬品規制調和国際会議) においても「科学的体系的アプローチによる医薬品製剤および製造工程の開発」が品質テーマとして取り上げられ, Q8-Q10 ガイドラインが国際調和された。科学的体系的アプローチによる開発を実際の医薬品製剤において実現するためには, 製剤特性を解析するための適切な評価法, および製造工程を解析するための適切な評価法の整備が必要不可欠である。そこで本研究では, 製剤特性評価法が定まっていない(1)超難溶性薬物製剤, (2)機能性製剤, (3)ナノ粒子 DDS 製剤等について, 製剤特性を評価する方法を開発し, 確立する。また, (4)製造工程中でリアルタイムあるいは超高速に製剤品質特性パラメータや製造工程パラメータの捕捉が可能な工程評価手法を開発, 確立することを目的とする。

B. 研究方法

本研究は, 上記 ICH 国際調和ガイドラインを含む本邦における医薬品品質分野ガイドラインの作成に中心的に寄与してきた国立試験研究機関の研究者, 我が国の代表的製薬企業等の研究者, および大学の主に医薬品製剤学分野の研究者が, 各種製剤の製剤評価技術および製造工程解析技術の手法の開発を産官学の協力で行った。(1) 超難溶性薬物製剤の物理薬剤学的評価研究 溶出特性を改善する手法として注目されている 1-1) 非晶質製剤, 1-2) ナノ微粒子製剤, 1-3) Cocrystal 製剤について, 品質確保に関わる製剤特性評価法を検討。(2) 機能性製剤の生物薬剤学的評価研究

2-1) 機能性製剤の評価手法としてのフローセル法：インドメタシン固体分散体やテオフィリン徐放錠等の種々条件下での溶出挙動の検討；2-2) 製剤設計とその評価：ビーグル犬を用いた塩基性薬物に対する有機酸添加の有用性の検討，および解析ソフト IVIVC Toolkit™ for WinNonlin®を用いた溶出挙動からの血中薬物濃度推移予測の検討；2-3) 非経口製剤の製剤特性評価法：外用剤・経皮吸収製剤の放出性評価における Microdialysis(MD)法の検討，リポソーム製剤ではアクティブターゲティング型リポソームの安定性・薬物放出性・付加状態の検討，リポソームと相互作用する分子の探索，さらに，リポソーム製剤に関する米国ガイドラインの調査。

(3) ナノ粒子 DDS 製剤等の体内動態に関わる製剤特性に関する研究

3-1) ナノ粒子製剤の物性・動態解析：ポリエチレングリコール (PEG) とポリグルタミン酸からなるブロック共重合体により，高分子-金属錯体形成によって形成される DACHPt 内包ミセル，シスプラチンミセルの調製し，その物性（粒径分布，安定性，薬剤放出速度）を解析するとともに，さらに，蛍光を有するミセル，粒子径の異なる蛍光標識ポリスチレンナノ粒子，それぞれに PEG 鎖を表面修飾したナノ粒子を HeLa 細胞に投与し，共焦点顕微鏡観察によるナノ粒子製剤の細胞内動態評価法を検討；3-2) ナノ粒子製剤の薬物放出特性評価法：オンラインで固相抽出が可能 HPLC 分析システムを構築し，ドキシソルビシン封入リポソーム製剤についてリポソームに保持されている薬物と遊離の薬物の分離定量法を検討，さらに，各種腫瘍モデルマウスを作製；3-3) 薬物トランスポーターの機能解析：腎・脈絡叢に発現する有機アニオントランスポーター OAT3 の遺伝子を欠損した Oat3(-/-) マウスに対し，脳室内投与後の脳室内からの薬物消失速度の測定，大脳皮質に投与後に脳内に残存する薬物量を測定。

(4) 製剤開発および製造工程管理手法研究

製品設計段階及び実製造工程における製剤評価に関する課題のスクリーニング結果に基づき，重要品質特性等を把握する評価技術として，赤外光音響分光法(PAS)，ステーションナリーバスケット法，粒度分布・分散安定性分析法，摩擦帯電量測定法，光励起非破壊検査法，超音波非接触測定法，飛行時間型二次イオン質量分析法

(TOF-SIMS)について検討；製造工程をリアルタイムあるいは超高速にモニタリングし，重要品質特性を管理するための分析評価手法として，ラマン，近赤外，テラヘルツ分光法，UHPLC/MS，内部蛍光検出法について検討。

(倫理面への配慮) 動物実験については，各研究機関の動物実験指針を遵守し，動物福祉・愛護の精神に基づいて実験を実施するものであり，倫理審査の承認を得ている。

C. 研究結果および考察

(1) 超難溶性薬物製剤の物理薬剤学的評価研究

1-1) 非晶質製剤：等温マイクロ熱量計を用い，非晶質製剤の物理的安定性(結晶化)の評価法を開発した。それによって，非晶質ニフェジピンの物理的安定性が粒子径に依存することを明らかにできた。粒子径が小さいほど表面の比率が大きいため，非晶質製剤粒子の表面は内部に比べ不安定であることを示す。今後，表面と内部の安定性の差が非晶質製剤の品質に及ぼす影響について検討する必要があると考える。また，水分活性測定法による製剤中の水分子の運動性評価法を開発した。40°C/75%RH で保存した非晶質製剤の結晶化や溶出性の変化(=不安定性)は水分活性値と関連し，安定性に及ぼす水分の影響の評価法として有用であることを明らかにした。

1-2) ナノ微粒子製剤：難溶性薬物の過飽和状態の安定性に大きく影響する水溶液中の薬物-高分子相互作用を¹H-NMR 差 NOE 測定によって検出する手法を開発した。また，湿式粉砕法によって得られるナノ微粒子の粒子径と関連する界面活性剤の表面自由エネルギーの極性成分(γ_p)の評価法を開発し，その有用性を明らかにした。

1-3) Cocrystal 製剤：4つの Cocrystal former (CF)を含む5種類の CF 混合物を用いる Cocrystal 結晶化のスクリーニング系を構築し，Cocrystal を形成するポテンシャルがあると推測できる CF の官能基の効率的絞り込みができることを明らかにした。

(2) 機能性製剤の生物薬剤学的評価研究

2-1) 機能性製剤の評価手法としてのフローセル法：溶出挙動に影響を及ぼす試験条件(試験液量，流速，セルの大きさ等)を明らかにした。また，溶出挙動やシンク条件設定等についてパドル法と比較し基礎的な情報を収集した。

2-2) 製剤設計とその評価：難溶性塩基薬物の経口製剤はクエン酸や酒石酸の添加，およびシクロデキストリンの添加により生物学的利用能（BA）が大きく改善されることを明らかにした。また，経口固形製剤の溶出から血中濃度を予測するための既存より優れた IVIVC 構築モデル式を確立した。

2-3) 非経口製剤の評価方法：ブタを用いた MD 試験は様々な組織中薬物濃度を連続測定でき，また，ラットにくらべヒト試験との乖離が少なく，外用剤評価の有用なツールであることを明らかにした。アクティブターゲット型リポソームの製剤特性を明確にし，評価方法の基礎を築いた。リポソームと相互作用する血清タンパク質を同定し，相互作用解析法を構築した。また，本製剤の品質の均一性を確保するのに有効な物理化学的性質とその評価方法を議論する必要性を提示した。

(3) ナノ粒子DDS製剤の体内動態に関わる製剤特性に関する研究

3-1) FRET 現象を利用した高分子ミセル等を調製し，蛍光顕微鏡イメージングによりナノ粒子の細胞内動態を観察する評価が有用であることを示した。また高分子ミセルの形成プロセスや物性を制御する特性として，内核の高次構造が重要であることを明らかとした。さらに，リポソーム製剤の体内動態を左右する特性として粒子サイズに注目し，新規サイズ分析法を開発した。

3-2) リポソーム製剤の製造工程評価，リポソームからのドキシソルビシンの放出測定，血中に存在する内在／遊離ドキシソルビシンの簡便な定量を可能にするリポソーム製剤の封入率測定システムを構築した。

3-3) 遺伝子欠損マウスや *untargeted* メタボローム解析を実施し，薬物の体内動態を左右する主要な生体内因子であるトランスポーターの機能解析手法を構築した。

(4) 製剤開発および製造工程管理手法研究

製造工程のモニタリング技術としてラマン分光法が，原薬の合成工程のモニタリング技術として UHPLC/MS が，また，コーティング工程モニタリング技術として近赤外，テラヘルツ分光法が，さらに，製造環境の微生物汚染のリアルタイム検出に細菌ディテクタを用いた内部蛍光検出法が有用であることを明らかにした。これらのモニタリング技術は，開発段階での製造

条件検討などにも適用可能であり，製造プロセスの理解及び開発の迅速化に役立つことが分かった。特に，しばしば問題を生じるスケールアップの際の条件検討に対応できることを実データにより示した。

製剤特性を評価する先端的手法としては，カンチレバー方式の赤外光音響分光法による赤外スペクトル測定，ステーションナリーバスケット法による溶出試験，摩擦帯電量測定法による打錠障害の評価，および粒度分布・分散安定性分析法による懸濁性製剤の再分散性の評価についてそれぞれ有用性を証明した。また，光励起非破壊検査，超音波非接触測定法や TOF-SIMS などの画像化技術により製剤の物理的および化学的情報が収集でき，製剤設計及び製造プロセスの理解を促進できることを示した。

D. 結論

1) 非晶質製剤の安定性に影響する因子の評価法としてマイクロ熱量測定法や水分活性測定法の有用性を明らかにした。湿式粉碎によるナノ微粒子製剤の製造に用いる分散媒特性の評価法を構築した。Cocrystal 形成ポテンシャルを有する CF の官能基を効率的に絞り込み可能なスクリーニング系を確立できた。

2) 難水溶性製剤の製剤機能・特性評価におけるフロースルーセル法の有用性，外用剤の製剤機能評価法としての MD 法の有用性を明らかにした。有機酸の添加により難溶性塩基薬物の BA を改善できた。また，改良 IVIVC 構築モデル式を確立した。さらにアクティブターゲット型リポソームの製剤特性の明確化ならびに評価方法の基礎を築いた。

3) 高分子ミセルの形成プロセスや物性を制御する特性として，内核の高次構造が重要であることを明らかとした。リポソーム製剤の体内動態に関わるサイズ分布や放出特性を評価する新規システムを構築することができた。また医薬品の体内動態を左右する生体内因子，トランスポーターの機能解析手法を構築した。

4) 医薬品の製剤開発時及び製造工程においてリアルタイムあるいは超高速に品質特性の評価及びモニタリングが可能な分析評価手法の開発研究を行い，ラマン，近赤外，テラヘルツ分光法及び内部蛍光検出法，UHPLC/MS による工程のリアルタイム評価が有用であることを示した。

また赤外光音響分光法, ステーショナルリーバスケット法, 粒度分布・分散安定性分析法, 摩擦帯電量測定法, 光励起非破壊検査法, 超音波非接触測定法, TOF-SIMS の製剤評価への応用の有用性が示された.

E. 研究発表

1. 誌上発表

- 1) Tamaki Miyazaki, Yukio Aso, Toru Kawanishi: Feasibility of atomic force microscopy for determining crystal growth rates of nifedipine at the surface of amorphous solids with and without polymers. *J. Pharm. Sci.*, **100**, 4413-4420 (2011).
- 2) Miyazaki T., Aso Y., Yoshioka S., Kawanishi T.: Differences in crystallization rate of nitrendipine enantiomers in amorphous solid dispersions with HPMC and HPMCP. *Int. J. Pharm.*, **407**, 111-118 (2011).
- 3) Sakai-Kato, K., Nanjo K., Kawanishi T., and Okuda H.: Rapid and sensitive method for measuring the plasma concentration of doxorubicin and its metabolites. *Chem. Pharm. Bull.*, **60**, 391-396 (2012)
- 4) Sakai-Kato, K., Ishikura, K., Oshima, Y., Tada, M., Suzuki, T., Ishii-Watabe, A., Yamaguchi, T., Nishiyama, N., Kataoka, K., Kawanishi, T., Okuda H.: Evaluation of intracellular trafficking and clearance from HeLa cells of doxorubicin-bound block copolymers, *Int. J. Pharm.*, **423**, 401-409 (2012)
- 5) Sakai-Kato K, Ota S, Hyodo K, Ishihara H, Kikuchi H, Kawanishi T.: Size separation and size determination of liposomes. *J. Sep. Sci.* **20**, 2861-2865, (2011).
- 6) Sakai-Kato, K., Ota, S., Takeuchi, T., Kawanishi, T.: Size separation of colloidal dispersed nanoparticles using a monolithic capillary column. *J. Chromatogr. A*, **1218**, 5520-5526 (2011).
- 7) Sakai-Kato, K., Hasegawa, T., Takaoka, A., Kato, M., Toyo'oka, T., Utsunomiya-Tate, N., Kawanishi, T.: Controlled structure and properties of silicate nanoparticle networks for incorporation of biosystem components. *Nanotechnology*, **22**, 205702 (2011).
- 8) Sakai-Kato, K., Saito, E., Ishikura, K., Kawanishi, T.: Analysis of intracellular doxorubicin and its metabolites by ultra-high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. B*, **878**, 1466-1470 (2010).
- 9) 宮崎玉樹, 阿曾幸男: 熱分析による非晶質医薬品の結晶化の評価. 熱測定, **38**, 125-131 (2011).
- 10) J. Zhang, K. Higashi, W. Limwikrant, K. Moribe, K. Yamamoto, Molecular-level characterization of probucol nanocrystal in water by in situ solid-state NMR spectroscopy. *Int. J. Pharm.*, in press.
- 11) Shunichirou Tsutsumi, Motoo Iida, Norio Tada, Takashi Kojima, Yukihiko Ikeda, Toshiya Moriwaki, Kenjiro Higashi, Kunikazu Moribe, Keiji Yamamoto: Characterization and evaluation of miconazole salts and cocrystals for improved physicochemical properties. *Int. J. Pharm.*, **421**, 230-236 (2011)
- 12) S. Yoshioka, K.M. Forney, Y. Aso, M.J. Pikal: Effect of sugars on the molecular motion of freeze-dried protein formulations reflected by NMR relaxation times. *Pharm. Res.* **28**, 3237-3247 (2011).
- 13) Wang, B., Cicerone, M. T., Aso, Y., Pikal, M. J.: The impact of thermal treatment on the stability of freeze-dried amorphous pharmaceuticals: II. Aggregation in an IgG1 fusion protein. *J. Pharm. Sci.*, **99**, 683-700 (2010).
- 14) 柴田寛子, 四方田千佳子: 米国 FDA のドキシルビシン封入 PEG リポソームに対する生物学的同等性試験ガイドライン (案) について, 医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス, **42**(11), 990-998 (2011)
- 15) Kazuo Maruyama: Intracellular targeting delivery of liposomal drugs for tumor delivery based on EPR effects, *Advanced Drug Delivery Rev.*, **63**, 161-169, 2011
- 16) 加藤くみ子: DDS 製剤評価の動向と今後の課題. *HUMAN SCIENCE*, **23**, 28-31 (2012).
- 17) 加藤くみ子: ナノメディシンに関する最近の動向. *ファルマシア*, **47**, 329-333 (2011).
- 18) 加藤くみ子: ナノテクノロジーを応用した製剤に関する評価とその課題. *薬剤学*, **71**, 114-117 (2011).
- 19) Y. Yamamoto, T. Fukami, T. Koide, T. Suzuki, Y. Hiyama, K. Tomono: Pharmaceutical evaluation of steroidal ointments by ATR-IR chemical imaging: Distribution of active and inactive pharmaceutical ingredients. *Int. J. Pharm.* **426**, 54-60 (2012).
- 20) S. Herlambang, M. Kumagai, S. Horie, S. Fukushima, M. Oba, T. Nomoto, K. Miyazaki, Y. Morimoto, N. Nishiyama, K. Kataoka: Disulfide crosslinked polyion complex micelles encapsulating

- dendrimer phthalocyanine directed to improved efficiency of photodynamic therapy. *J. Control. Release*, **155** (3), 449-457 (2011).
- 21) E. Yamamoto, K. Hyodo, N. Ohnishi, T. Suzuki, H. Ishihara, and H. Kikuchi: Direct, simultaneous measurement of liposome-encapsulated and released drugs in plasma by on-line SPE-SPE-HPLC. *J. Chromatogr. B*, **879**, 3620-3625 (2011)
- 22) Miyajima, M., Kusuhara, H., Fujishima, M., Adachi, Y., Sugiyama, Y.: Organic anion transporter 3 mediates the efflux transport of an amphipathic organic anion, dehydroepiandrosterone sulfate, across the blood-brain barrier in mice. *Drug Metab Dispos*, *in press*
2. 学会発表 (42 報のうち 25 報を記載)
- 1) 阿曾幸男, 宮崎玉樹, 川西徹: 等温ミクロ熱量計による非晶質ニフェジピン粉砕物の物理的安定性の評価. 日本薬剤学会第 26 年会(2011.5).
- 2) Yukio Aso, Tamaki Miyazaki, and Toru Kawanishi: Crystallinity of ground lactose hydrate determined by ¹³C-NMR. American Association of Pharmaceutical Scientists, Annual Meeting and Exposition (2011.10).
- 3) 阿曾幸男, 宮崎玉樹, 奥田晴宏: ¹³C-固体高分解能 NMR による市販製剤中のジヒドロピリジン系医薬品の存在状態の検討. 日本薬学会第 132 年会(2012.3).
- 4) 植田圭祐, Waree Limwikrant, 東頭二郎, 関根秀一, 森部久仁一, 堀江利治, 山本恵司: 第 28 回製剤と粒子設計シンポジウム, 大阪, 2011 年 10 月
- 5) 田尻智計, 坂本良作, 山梨繁行, 北村智: 腸溶性製剤の最適な in vitro 溶出試験法の検討. 日本薬学会第 132 年会 (2012.3)
- 6) 柴田寛子, 川西徹, 四方田千佳子: ドキソルビシン封入リポソームの in vitro 薬物放出における pH, 温度, 超音波の影響. 日本薬剤学会第 26 年会 (2011.5)
- 7) Hiroko Shibata, Chikako Yomota, Toru Kawanishi: Effect of pH, temperature, and ultrasound on drug-release from doxorubicin-encapsulated liposome. AAPS (2011.10)
- 8) 柴田寛子, 四方田千佳子, 川西徹: 逆相 HPLC-蒸発光散乱検出器を用いたリポソーム製剤中の脂質成分定量法の検討 日本薬学会第 132 年会 (2012.3)
- 9) 兵頭健治, 山本栄一, 大西直角, 鈴木卓也, 石原比呂之, 菊池寛, 浅川直樹: 日本薬剤学会第 26 年会, 東京, 2011 年 5 月
- 10) 山本栄一, 大西直角, 鈴木卓也, 兵頭健治, 石原比呂之, 菊池寛, 浅川直樹: 日本薬剤学会第 26 年会, 東京, 2011 年 5 月
- 11) 山本栄一, 大西直角, 鈴木卓也, 兵頭健治, 石原比呂之, 菊池寛, 浅川直樹: 第 27 回日本 DDS 学会学術集会, 東京, 2011 年 6 月
- 12) Eiichi Yamamoto: The 11th US-Japan Symposium on Drug Delivery System, Hawaii, USA. 2011 年 12 月
- 13) 加藤くみ子: ナノ DDS 製剤開発に関する動向と評価手法研究. 日本薬学会第 132 年会 札幌, 2012 年 3 月 29 日
- 14) 加藤くみ子: 東京ナノテクノロジーを応用した製剤開発に関する動向. 第 20 回 固形製剤処方研究会 シンポジウム, 東京, 2011 年 11 月 29 日
- 15) 加藤くみ子, 石倉恵子, 水端美保, 西山伸宏, 片岡一則, 川西徹: ドキソルビシン結合高分子ミセルの細胞内動態に関する評価研究. 第 27 回日本 DDS 学会学術集会, 東京, 2011 年 6 月 9 日
- 16) 加藤くみ子, 水端美保, 大島裕希, 兵頭健治, 石原比呂之, 菊池寛, 川西徹: ナノメディスンのサイズ・表面物性評価法の検討. 日本薬剤学会第 26 年会, 東京, 2011 年 5 月 31 日.
- 17) T. Sakamoto, K. Nakayama, D. Sasakura, T. Kawanishi, Y. Hiyama: Vibrational Spectroscopic analysis of pharmaceuticals and tablet process understanding using near-, mid-, and far-infrared / terahertz spectroscopy. IUPAC International Congress on Analytical Sciences 2011 (2011. 5 Kyoto)
- 18) T. Sakamoto, K. Nakayama, A. Portieri, D. Arnone, D. Sasakura, P. Taday, A. Zeitler, T. Kawanishi, Y. Hiyama: Time-course analysis of tablet film-coating using terahertz pulsed imaging. 36th International Conference on Infrared, Millimeter and Terahertz Waves (2011. 10 TX, USA)
- 19) T. Koide, N. Sanada, M. Tozu, N. Katori, T. Kawanishi, Y. Hiyama: Study on Evaluation of solid dosage forms using TOF-SIMS chemical mapping and NIR chemical imaging techniques. 2011 AAPS Annual Meeting and Exposition (2011.10 Washington DC, USA)
- 20) 藤沼健太, 米持悦生, 吉橋泰生, 寺田勝英: 処方粉体の打錠用杵への付着性と相互作用パラメータの検討. 第 28 回製剤と粒子設計シンポジウム (2011.10 大阪)
- 22) 坂本知昭: 医薬品製造工程管理ツールとしての SFC への期待. SFC 研究会 (2012.2 東京)
- 23) 小出達夫, 眞田則明, 戸津美矢子, 川西徹, 檜山行雄: 飛行時間型二次イオン質量分析法 (TOF-SIMS) を用いた固形製剤におけるステアリン酸マグネシウム分布の解析. 日本薬学会 132 年会 (2012.3 札幌)
- 24) 坂本知昭, 長門琢也, 細野哲矢, Axel Zeitler, 香取典子, 奥田晴宏: テラヘルツパルスイメージングによるコーティング欠陥の検出. 日本薬学会第 132 年会 (2012.3 札幌)
- 25) 坂本知昭, 渡邊英俊, 香取典子, 奥田晴宏: ハイスループット ODS カラムを用いたプロプラノロールのワンポットーツーステップ合成工程のリアルタイム解析. 日本薬学会第 132 年会 (2012.3 札幌)
- F. 知的財産権の出願・登録状況
なし