

療開発において IL-17 の発現制御、作用制御および Th17 の分化制御が有用であることを示している。現在までに、自己免疫疾患で上昇するサイトカイン IL-6 と TGF- β の刺激で ROR γ t の発現が誘導され、IL-17 の転写を調節すること、Th17 細胞の分化に転写因子 ROR γ t が必須であることが報告されている (Ivanov II *et al.*, 2006, *Cell*, Ichiyama K *et al.*, 2008, *J Biol. Chem.*)。IL-17 の発現調節に関わる全遺伝子が解明されれば、病態メカニズムの解明および新規治療ターゲットの同定に極めて有用であるが、IL-17 の発現制御メカニズム、Th17 細胞の分化メカニズムはその多くが未解明である。

これらのことより、本研究では IL-17 の発現制御メカニズムを調べ、アレルギー疾患、自己免疫疾患の新たな創薬ターゲット遺伝子を同定することを目的とし、IL-17 の発現を制御する因子をゲノムワイドに探索した。

B. 研究方法

(1) IL-17 発現制御因子の探索

1. ハイスループット遺伝子導入アッセイとマイクロアレイ解析による一次スクリーニング

i) ハイスループット遺伝子導入アッセイ、アッセイ・プレートの作製

MGC ライブラリはそれぞれのプラスミドが大腸菌に導入された状態で、96 ウェルプレート上で -80°C の超低温冷凍庫で凍結保存している。その一部を別の 96 ウェルプレート上の液体培地に移し、 37°C で振盪培養して増殖させた後、遠心してペレット状にし、96 ウェルフォーマットの吸引式ミニプレップでプラスミドを精製した。それぞれのプラスミド濃度をプレート・リーダーで測定後、濃度調整装置により 50ng/well となるように希釈し、自動分注機を用いて 384 ウェルプレートにライブラリを高密度に配置したアッセイ・プレートを作製した。作製したアッセイ・プレートは密閉後、 -20°C で凍結保存し、室温で融解した後に使用した。

ii) ハイスループット遺伝子導入アッセイ

アッセイ・プレートにレポーター・プラスミド、遺伝子導入試薬及び細胞を自動分注機で加えることで遺伝子導入 (リバース・トランスフェクション) した。一定時間 37°C の CO_2 インキュベーター内で培養した後、Bright-Glo™ Luciferase Assay System (Promega) を用いてルシフェラーゼ活性を測定した (図 1)。384 ウェルプレート

1 枚では全てのプラスミドの遺伝子導入は物理的に不可能であり、多数の 384 ウェルプレートを使用することになった。このことにより、アッセイ条件が各プレートで若干異なることになり、プレート間でバックグラウンドの数値が変動する可能性が考えられた。そのため、それぞれの 384 ウェルプレートに MGC ライブラリのプラスミドを配置させていないウェルを用意し、そのウェルをコントロールとすることにより、各プレートで数値を補正する作業を加えて、より確実に正確なデータ解析を行った。

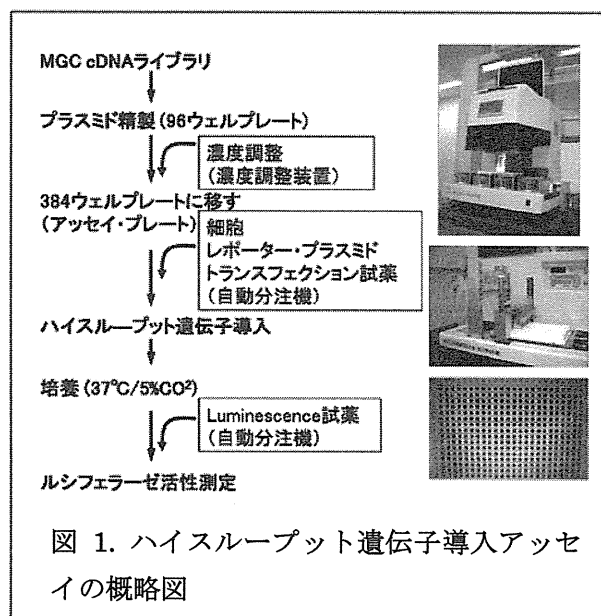


図 1. ハイスループット遺伝子導入アッセイの概略図

2. マイクロアレイ解析

公的データベースより Th1、Th2、Th17 細胞のマイクロアレイデータを取得し、それぞれの遺伝子発現プロファイルより、遺伝子発現の比較解析を行った。

3. 二次スクリーニング

一次スクリーニングで候補となった因子から、IL-17 を特異的に制御する候補因子を絞り込むため、IL-4 と IFN γ のプロモーターの下流にルシフェラーゼ遺伝子を繋いだレポーター・プラスミドと候補因子の発現プラスミドを用いて遺伝子導入アッセイを行った。

その後、個々の候補因子について、創薬ターゲットの可能性を遺伝子データベース等の情報を活用して探索することで、更なる絞り込みを行った。

(2) Th17 細胞分化および軟骨分化に関わる miRNA のプロファイリング

1. miRNA マイクロアレイ解析

マウスナイーブ T 細胞を用いた *in vitro* での Th17 細胞分化系を利用してサンプルを採取し、miRNA マイクロアレイ解析を行い、Th17 細胞での miRNA のプロファイリングを行った。

また、マウス軟骨培養細胞に Sox9 を強制発現するアデノウィルスに感染させてサンプルを採取し、同様に miRNA のマイクロアレイ解析を行った。

(倫理面への配慮)

遺伝子組み換え実験については、独立行政法人国立成育医療研究センターの規約に則り、申請者は「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」(平成 15 年法律第 97 号、平成 16 年 2 月 19 日より施行)を遵守して行うことを誓約し、許可を得ている。

ヒトクローン胚、ヒト ES 細胞などは使用していない。遺伝子治療などの臨床・疫学研究は行っていない。本研究においては、患者サンプルを使用しているが、所属機関において倫理審査を行い、承認を得ており、倫理的に問題はない。

C. 研究結果

(1) IL-17 発現制御因子の探索

MGC ライブラリ由来の約 6000 種類の遺伝子の発現プラスミドを 384 ウェルプレートに高密度に配置したアッセイ・プレートを作製し、これと IL-17 の発現を検出する、IL-17 のプロモーターの下流にルシフェラーゼ遺伝子を繋いだレポーター・プラスミド (pIL-17A) を用いてハイスループット遺伝子導入アッセイを行い、IL-17 の発現制御に関わる因子をゲノムワイドに探索した。

まず、pIL-17A プラスミドとこのレポーター活性を増加させることが明らかとなっている ROR γ t の発現プラスミドを用いて、384 ウェルプレートで細胞数、プラスミド量、遺伝子導入試薬の濃度、培養時間などの条件検討を行った。細胞は遺伝子導入効率がよい 293FT 細胞を用いることにした。この細胞で条件検討を行ったところ、細胞数が 4,000、pIL-17A プラスミドが 12ng、遺伝子導入試薬である FuGENE@6 Transfection Reagent (Roche) は 0.1 μ l で遺伝子導入し、24 時間後にルシフェラーゼ活性を測定したとき、ROR γ t の発現プラスミドの有無で 3~4 倍のルシフェラーゼ活性の増加が見られ、数値も良好な結

果が得られた (図 2)。

しかし、pIL-17A 単独でのルシフェラーゼ活性は数値として 100 程度と低く、pIL-17A のルシフェラーゼ活性を抑制するような因子、すなわち IL-17 の発現抑制因子を見出すことが難しいと考えられた。そこで、pIL-17A と共に ROR γ t の発現プラスミドを加えた状態でハイスループット遺伝子導入アッセイを行うことでベースとなる数値を大きくし、このルシフェラーゼ活性を増減させるものを IL-17 の発現制御因子候補とすることを考えた。これまでに転写因子 Gfi-1 が ROR γ t による IL-17 の転写促進を抑制する因子として報告されていた (Ichiyama *et al.*, 2009, *Int Immunol.*)。そこで、ROR γ t 発現プラスミドと Gfi-1 発現プラスミドの有無で条件検討を行ったところ、Gfi-1 の発現により 50~90%程度のルシフェラーゼ活性の減少が検出できた (図 3)。

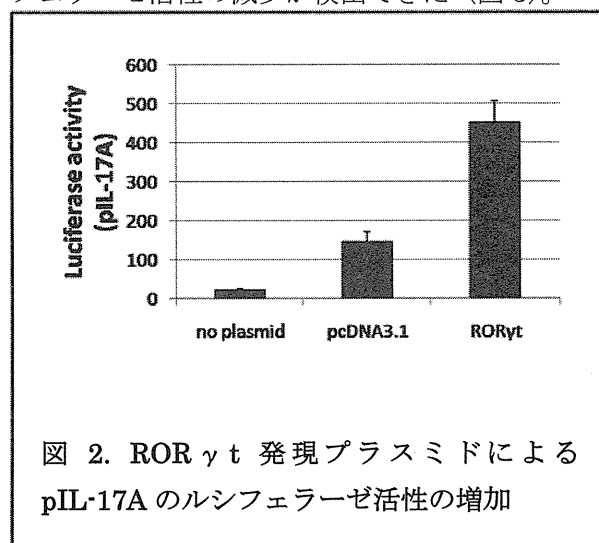


図 2. ROR γ t 発現プラスミドによる pIL-17A のルシフェラーゼ活性の増加

これらの条件検討より、本研究においては 4000 個の 293FT 細胞を用いて遺伝子導入試薬 FuGENE@6 Transfection Reagent は 0.1 μ l、プラスミドは(1)pIL-17A (12ng)、(2)ROR γ t (12ng)、(3)MGC ライブラリ (50ng) でリバース・トランスフェクションを行い、24 時間培養後、ルシフェラーゼ活性を測定することにした (図 4)。

上記の条件で、MGC ライブラリを 384 穴プレートへ配列させたアッセイ・プレートに各種プラスミドと遺伝子導入試薬を混ぜたものを自動分注機で分注し、さらに 293FT 細胞を分注してハイスループット遺伝子導入アッセイを行った。このスクリーニングは 2 度繰り返しの実験を行い、解析データとした。

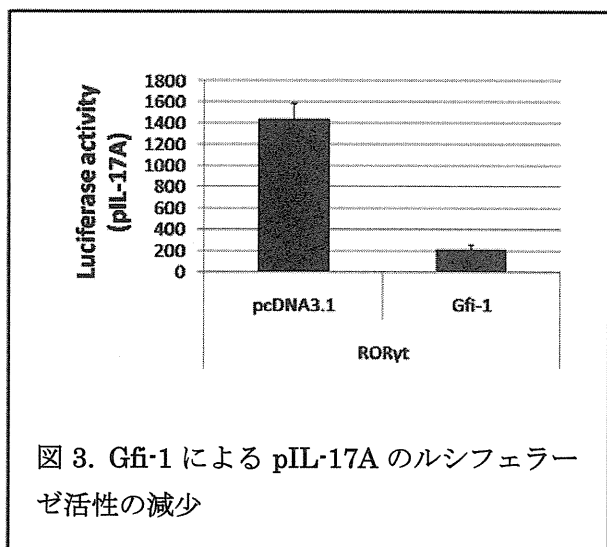


図 3. Gfi-1 による pIL-17A のルシフェラーゼ活性の減少

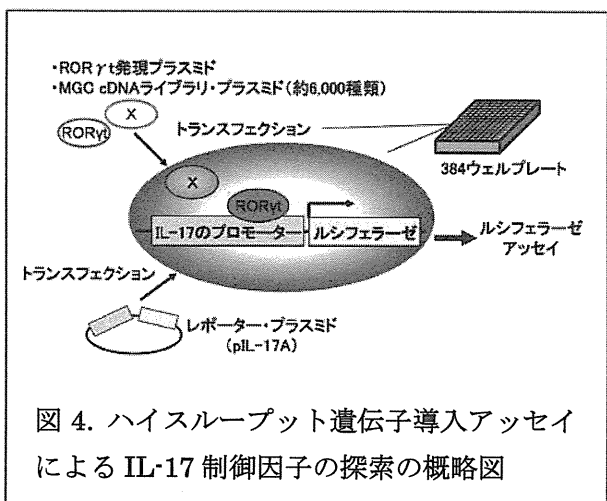


図 4. ハイスループット遺伝子導入アッセイによる IL-17 制御因子の探索の概略図

また、本スクリーニング・システムは制御因子を効率よく同定する解析法ではあるが、それぞれの因子を強制発現させるため、実際に Th17 で発現して IL-17 の発現制御を行っているかどうかはわからない。そこで、公的データベースより Th1、Th2、Th17 細胞のマイクロアレイデータを取得、比較解析し、Th17 細胞で発現が高い因子というもう一つの閾値を加えて解析することにした。

これらの解析の結果、ルシフェラーゼ活性を 3 倍以上増加させた 52 の因子およびルシフェラーゼ活性を 1.5 倍以上増加させた因子で、さらにマイクロアレイによる遺伝子発現プロファイルで、他のヘルパー T 細胞サブセットである Th2 に比べ Th17 でシグナルが 2 倍以上であった 94 因子の合計 141 の因子を制御因子候補とした。

これら、141 の IL-17 発現制御因子候補におい

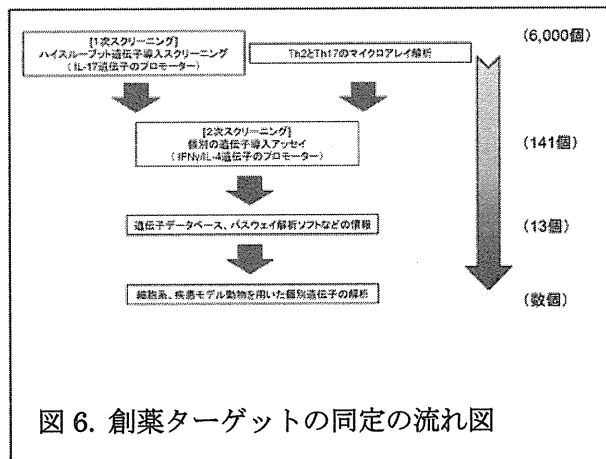
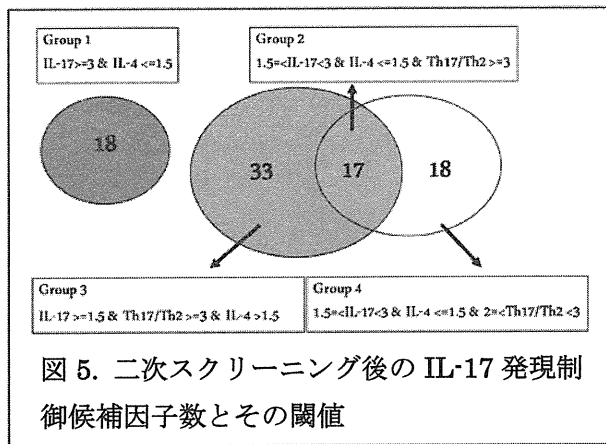
て創薬ターゲットを絞り込むことを目的として、更なるスクリーニングを行うことにした。Th1、Th2 細胞でそれぞれ発現する IL-4、IFN γ のプロモーターの下流にルシフェラーゼ遺伝子を繋いだレポーター・ベクターを使用して、IL-17 発現制御因子候補において、これらのルシフェラーゼ活性を上昇させない IL-17 の発現制御に特異性を持った因子をより優先度の高い創薬ターゲットとすることにした。

上記の解析の結果を受けて、創薬ターゲットの絞り込みを再検討し、

1. IL-17 のレポーター・プラスミドの活性を 3 倍以上上昇させ ($IL-17 \geq 3$)、IL-4 のレポーター・プラスミドの活性が 1.5 倍以下 ($IL-4 \leq 1.5$) の 18 因子: **Group 1**
2. IL-17 のレポーター・プラスミドの活性が 1.5 倍以上 3 倍より小さく ($1.5 \leq IL-17 < 3$)、IL-4 のレポーター・プラスミドの活性が 1.5 倍以下 ($IL-4 \leq 1.5$) で、マイクロアレイのデータで Th2 に比べ Th17 でシグナルが 3 倍以上 ($Th17/Th2 \geq 3$) の 17 因子: **Group 2**
3. IL-17 のレポーター・プラスミドの活性が 1.5 倍以上 ($IL-17 \geq 1.5$)、マイクロアレイのデータで Th2 に比べ Th17 でシグナルが 3 倍以上 ($Th17/Th2 \geq 3$)、IL-4 のレポーター・プラスミドの活性が 1.5 倍より高い ($IL-4 > 1.5$) の 33 因子: **Group 3**
4. IL-17 のレポーター・プラスミドの活性が 1.5 倍以上 3 倍より小さく ($1.5 \leq IL-17 < 3$)、IL-4 のレポーター・プラスミドの活性が 1.5 倍以下 ($IL-4 \leq 1.5$) で、マイクロアレイのデータで Th2 に比べ Th17 でシグナルが 2 倍以上で 3 倍より小さい ($3 \Rightarrow Th17/Th2 < 3$) の 18 因子: **Group 4**

の 4 つの異なるパラメーターで合計 86 因子を創薬ターゲットとして絞り込んだ (図 5)。

これらの個々の候補因子について、Th17 に関わるものが報告されているか、自己免疫疾患やアレルギー疾患との関わりが無いかな等を数種の遺伝子データベースや既存のパスウェイ解析ソフトなどの情報を利用して、創薬ターゲットの可能性を探索した。これらの解析により、創薬において特に重要と思われる候補因子を 5 個、Th17 の分化メカニズムにおいて興味深い候補因子を 8 個の合計 13 個の候補因子を見出した (図 6)。



(2) Th17 細胞分化および軟骨分化に関わる miRNA のプロファイリング

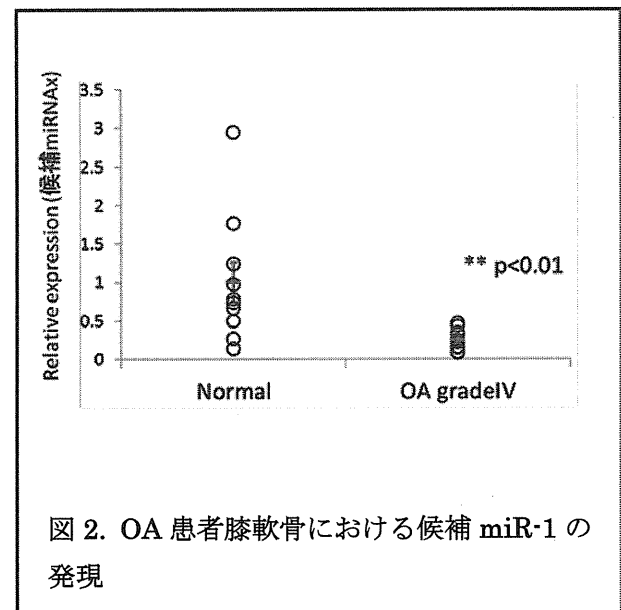
近年、様々な疾患に関わることが示されてきている miRNA (マイクロ RNA) について、Th17 細胞の分化および軟骨細胞分化に関わる miRNA (マイクロ RNA) を探索した。

マウスナイーブ T 細胞を *in vitro* で Th17 細胞に分化誘導し、マイクロアレイ解析にて発現が変動する miRNA を探索した。この解析により、Th17 細胞の分化に関わると考えられる miRNA を複数同定した。

また、軟骨分化に関わる miRNA をプロファイリングすることを目的として、マウス胎生 15.5 日胚の肋軟骨由来の培養軟骨細胞に、軟骨分化において重要な転写因子である Sox9 をアデノウイルス感染により強発現させて RNA を抽出し、同様にマイクロアレイ解析を行った。この結果、3 個の miRNA が Sox9 の強発現により発現が増加した。これらの候補 miRNA のうち、候補 miRNax に注目し、以下の解析を行った。

まず、ヒト膝関節由来の軟骨細胞と未分化なヒト間葉系幹細胞 (Mesenchymal stem cells: MSC) における候補 miRNax の発現を定量 PCR により解析を行った結果、MSC に比べ軟骨細胞において、発現が高いことを確認した。また MSC 軟骨分化誘導により候補 miRNax の発現が増加することが観察された。これらの結果は、候補 miRNax が軟骨分化に関わる miRNA であることを強く示唆する。

次に、変形性関節症 (OA) 患者の膝軟骨における候補 miRNax の発現について検討したところ、候補 miRNax は OA 患者群で有意に発現が低下する傾向を示した (図 7)。さらに、ヒト軟骨初代培養細胞に炎症性サイトカインである IL-1 β を加えて培養する *in vitro* OA モデルで候補 miRNax の発現を調べたところ、候補 miRNax の発現は有意に低下した。これらの結果は、候補 miRNax が OA の病態に関わる miRNA であることを強く示唆する。



D. 考察

本研究では、IL-17 の発現制御因子を探索するため、IL-17 のレポーター・プラスミドと約 6000 個の cDNA ライブラリを使用したハイスループット遺伝子導入スクリーニングと、Th2 と Th17 のマイクロアレイデータ解析を組み合わせた一次スクリーニングを行った。その後、IL-4、IFN γ のレポーター・プラスミドを用いた更なる遺伝子導入レポーター・アッセイ、遺伝子データベース

等の情報を活用した二次スクリーニングを行い、自己免疫疾患の新たな創薬ターゲットとして 13 個の新規 IL-17 の発現制御因子候補を見出した。これらの IL-17 制御因子候補は、有力な IL-17 制御因子候補であることから、有望な自己免疫疾患、アレルギー疾患の創薬ターゲットである。

また、Th17 細胞の分化に関わると考えられる miRNA をマイクロアレイ解析によりプロファイリングし、Th17 細胞分化で発現が変動する miRNA を同定した。近年、遺伝子の発現を転写後レベルで負に制御する miRNA は様々な疾患に関わることが示されてきており、疾患の複雑な遺伝子ネットワークを理解する上で重要な因子となっている。これらの個々の miRNA は Th17 細胞分化に重要な因子と考えられるため、アレルギー疾患、自己免疫疾患の病態に関わる可能性のある重要な創薬ターゲットである。今後、これらの IL-17 の発現制御因子候補および Th17 細胞分化で発現が変動する miRNA は、Th17 細胞分化にどのように関わるか、アレルギー疾患、自己免疫疾患の病態にどのように関わるかを詳細に解析し、病態に密接に関係することが確認できた因子については、疾患モデル動物を使用した遺伝子強制発現や発現抑制の研究を行い、治療効果を検討する。更に、ターゲット候補を標的とした化合物スクリーニングを行い、これら化合物は疾患モデルマウスにおいて治療効果を検討する。これらにより、アレルギー疾患、自己免疫疾患に対する新規治療法や診断法の開発を目指す。

一次スクリーニングで見出した 141 の候補因子は上記 13 の創薬ターゲットに劣ることのない IL-17 制御因子候補である。また、現時点では IL-17 の発現を増加させる候補因子のみを解析対象として選別しているが、発現を抑制する候補因子に関しても病態に関わると考えられる興味深い因子である。これらに加え、本研究で見出した Th17 細胞の分化に関わると考えられる miRNA も含め、IL-17 の発現制御を中心とした Th17 細胞の分化メカニズム、分子ネットワークを包括的に解明する上で重要なデータが本研究により得られた。これらのデータは自己免疫疾患、アレルギー疾患の病態に重要な Th17 細胞の理解に繋がり、病態メカニズムの全容解明に繋がるものと考えられる。

また、本研究では培養軟骨細胞に Sox9 を強発現させて発現が変動した miRNA を同定した。Sox9

は軟骨分化において重要な転写因子であることから、これらは軟骨分化に関わる miRNA であることが予想される。これまでに軟骨分化に関わる miRNA として miR-140 が同定されており、ヒト疾患サンプルおよびノックアウトマウスの詳細な解析により、変形性関節症 (OA) に関わることが報告されている (Miyaki S., et al., *Arthritis Rheum.* 2009; Miyaki S., et al., *Genes Dev.* 2010)。このことより、本研究で見出した軟骨分化に関わると考えられる miRNA も OA 等、関節の破壊を伴う疾患に関わる可能性が考えられ、OA 患者の軟骨細胞で発現を確認したところ、本研究で注目した候補 miRNA の発現は OA 患者で有意に発現が低下していた。今後、疾患モデル動物等を用いて、更なる解析を行い、それらをターゲットとする治療法について検討することで、新たな治療法、診断法の開発を目指す。

本研究では民間企業、大学、研究機関の官民共同による綿密な打ち合わせによりデザイン、実施された研究により、これまでに報告されていない新規の IL-17 制御因子候補を同定し、さらに Th17 細胞で発現が変動する miRNA を複数同定した。これらにより、これまでにない規模で IL-17 の発現制御を中心とした Th17 細胞の分化制御の分子ネットワークを解明する上で重要なデータが得られた。本研究で利用したハイスループット遺伝子導入アッセイは、これまでの既存の手法では困難な創薬ターゲットの選定を効率的かつスピーディーに決定することができる。このシステムは、今後の継続的かつ様々な運営/活用により、多くの疾患メカニズムの解明につながることを期待できると考えられる。

E. 結論

ポストゲノム時代における、新たなアプローチである全長 cDNA 遺伝子導入による機能的スクリーニングのシステムを用いて、IL-17 の発現制御に関わる因子をスクリーニングした。これに加え、マイクロアレイによる遺伝子発現プロファイル、遺伝子データベース等を利用したバイオインフォマティクスによる情報処理を組み合わせたシステム・アプローチによる解析を行い、アレルギー疾患、自己免疫疾患の創薬ターゲット候補を短時間で効率よく、スクリーニングすることができた。

また、マイクロアレイ解析により、Th17 細胞分化で発現が変動する miRNA を同定した。この

データを含め、IL-17 発現制御を中心とした Th17 細胞の分化制御の複雑な分子ネットワークを解明する上でこれまでにない規模で重要なデータが得られた。

なし

さらに、Sox9 を強発現させた培養軟骨細胞で発現が変動する miRNA を網羅的に解析し、軟骨分化に関わると考えられる miRNA を同定した。そのうち、一つの miRNA に注目して解析を行い、この候補 miRNA が OA の病態に関わることを強く示唆する結果を得た。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Yokoyama S, et al. A systems approach reveals that the myogenesis genome network is regulated by the transcriptional repressor RP58. *Dev Cell*. 2009; 17(6): 836-848.
2. Miyaki S, et al. MicroRNA-140 plays dual roles in both cartilage development and homeostasis. *Genes Dev*. 2010; 24(11): 1173-1185.
3. Ito Y, et al. The Mohawk homeobox gene is a critical regulator of tendon differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010; 107(23): 10538-10542.

2. 学会発表

1. Matsui A, et al. The role of Wnt/ β -catenin signaling in Th17 cell differentiation. 第 21 回 Kyoto T Cell Conference, Kyoto, Japan. June 10-11, 2011.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

今後、スクリーニングで得られた遺伝子を創薬に応用する内容で特許の出願を予定している。

2. 実用新案登録

なし

3. その他

自己免疫疾患、アレルギー疾患の治療を目標としたヘルパーT細胞の分化に関わる因子の探索

所 属 独立行政法人国立成育医療研究センター研究所
システム発生・再生医学研究部

研究者 浅原 弘嗣

研究要旨

*in vitro*で誘導したTh17細胞をサンプルとしてマイクロアレイによりTh17細胞で発現の高いmiRNAをプロファイリングした。また、培養軟骨細胞にSox9を強発現させて同様にマイクロアレイによりmiRNAをプロファイリングした。

研究分担者

- (1) 独立行政法人国立成育医療研究センター研究所
高田 修治、伊藤 義晃
- (2) 東京薬科大学
高橋 勇二
- (3) 日本ペーリンガーインゲルハイム株式会社
鈴木 忍、佐藤 弥生、尾崎 修子
- (4) 大塚製薬株式会社
川染 秀樹

A.研究目的

喘息、アレルギー鼻炎やアトピー性皮膚炎などに代表されるアレルギー疾患は、現在約3人に1人が罹患している。この疾患は、外部の様々な抗原（アレルゲン）に対し、生体内で過剰に免疫反応が起こることで発症する。免疫反応は外来の異物を排除するために働く、生体にとって不可欠な生体反応であるが、疾患の原因となるアレルゲンは、多くの場合、通常生活でさらされる量では無害なことが多く、患者にとっては不快な免疫応答で苦しむことになる。同じように過剰な免疫反応により引き起こされる疾患としては、関節リウマチや全身性エリテマトーデスなどの自己免疫疾患があげられる。この疾患は自己を構成する内部の物質を間違っアレルゲンとして認識され引き起こされる。両疾患はアレルゲンが外部か内部かという点で異なるが、発症原因が過剰な免疫反応という点で同一である。これらの病気はいくつかの治療法が実施／試行されているが、完治させることが困難であり、長期化し、改善どころか悪化の一途をたどる症例が少なくない。

ナイーブT細胞が抗原提示を受けて分化するヘルパーT細胞のサブセットで、IL-12やIFN- γ などの刺激により分化誘導されるTh1細胞、IL-4などにより分化誘導されるTh2細胞は獲得性免疫応答に重要な役割を担っている。Th1細胞は主にIFN- γ をTh2細胞はIL-4を発現し、それらのサイトカインの作用を通して、相互に分化や機能を抑制し合っている。この両者のバランスが免疫応答を制御する上で重要であり、このバランスが崩れると、自己免疫疾患やアレルギー疾患の発症につながると考えられてきた。

近年、IL-17を発現する新たなT細胞サブセットであるTh17細胞が同定され、自己免疫疾患やアレルギー疾患の発症や病態形成に重要な役割を果たしていることが明らかとなった。この発見により、Th1とTh2のバランスでは説明できなかった病態や現象に新たな展開を与えるとともに、これまでTh1とTh2のバランスでのみ説明されてきた免疫応答の分子メカニズムに大きな変更点を加えられることになった。

近年の遺伝子改変技術と疾患モデル動物技術による解析で、IL-17遺伝子欠損マウスは、自己免疫疾患、アレルギー疾患を強く抑制されることが示されている（Nakae S *et al.*, 2002, *Immunity*, Nakae S *et al.*, 2003, *J Immunol.*）。このことは、自己免疫疾患、アレルギー疾患の治療開発においてIL-17の発現制御、作用制御およびTh17の分化制御が有用であることを示している。現在までに、自己免疫疾患で上昇するサイトカインIL-6とTGF- β の刺激でROR γ tの発現が誘導され、IL-17の転写を調節すること、Th17細胞の分化に転写因子ROR γ tが必須であること

が報告されている (Ivanov II *et al.*, 2006, *Cell*, Ichiyama K *et al.*, 2008, *J Biol. Chem.*)。IL-17 の発現調節に関わる全遺伝子が解明されれば、病態メカニズムの解明および新規治療ターゲットの同定に極めて有用であるが、IL-17 の発現制御メカニズム、Th17 細胞の分化メカニズムはその多くが未解明である。

これらのことより、本研究では IL-17 の発現を制御する因子をゲノムワイドに探索し、それが関わる疾患、特に自己免疫疾患の新たな創薬ターゲット遺伝子を同定することを目的とする。

B. 研究方法

1. miRNA マイクロアレイ解析

マウスナイーブ T 細胞を用いた *in vitro* での Th17 細胞分化系を利用してサンプルを採取し、miRNA マイクロアレイ解析を行い、Th17 細胞での miRNA のプロファイリングを行った。

また、マウス軟骨培養細胞に Sox9 を強制発現するアデノウィルスに感染させてサンプルを採取し、同様に miRNA のマイクロアレイ解析を行った。

(倫理面への配慮)

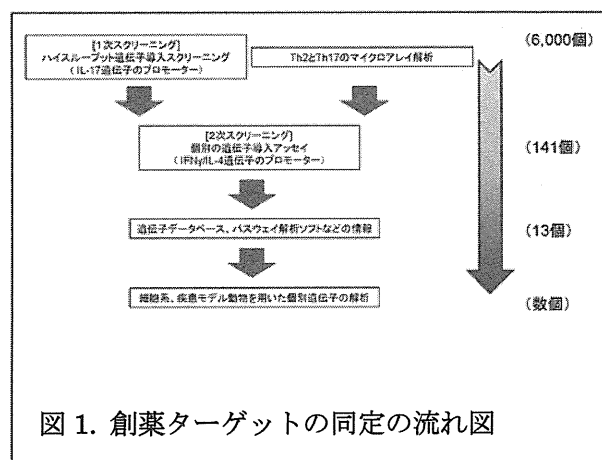
遺伝子組み換え実験については、独立行政法人国立成育医療研究センターの規約に則り、申請者は「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」(平成 15 年法律第 97 号、平成 16 年 2 月 19 日より施行)を遵守して行うことを誓約し、許可を得ている。

ヒトクローン胚、ヒト ES 細胞などは使用していない。遺伝子治療などの臨床・疫学研究は行っていない。本研究においては、患者サンプルを使用しているが、所属機関において倫理審査を行い、承認を得ており、倫理的に問題はない。

C. 研究結果

昨年度までに、MGC ライブラリ由来の約 6000 種類の遺伝子の発現プラスミドを 384 ウェルプレートに高密度に配置したアッセイ・プレートを作製し、これと IL-17 の発現を検出する、IL-17 のプロモーターの下流にルシフェラーゼ遺伝子を繋いだレポーター・プラスミド (pIL-17A) を用いてハイスループット遺伝子導入アッセイを行い、IL-17 の発現制御に関わる因子をゲノムワイドに探索した。また、このスクリーニング・システムでは制御因子を効率よく同定することができるが、それぞれの因子を強制発現させるため、実際に Th17 で発現して IL-17 の発現制御を行っ

ているかどうかはわからないため、公的データベースより Th1、Th2、Th17 細胞のマイクロアレイデータを取得、比較解析し、Th17 細胞で発現が高い因子というもう一つの閾値を加えて解析し、さらに Th1、Th2 細胞でそれぞれ発現する IL-4、IFN γ のプロモーターの下流にルシフェラーゼ遺伝子を繋いだレポーター・ベクターを使用して、IL-17 発現制御因子候補において、これらのルシフェラーゼ活性を上昇させない IL-17 の発現制御に特異性を持った因子をより優先度の高い創薬ターゲットとして二次スクリーニングを行った。これらの解析により見出した因子をさらに自己免疫疾患やアレルギー疾患との関わりが無いかな等を数種の遺伝子データベースや既存のパスウェイ解析ソフトなどの情報を利用して、創薬ターゲットの可能性を探索した。これらの解析により、創薬において特に重要と思われる候補因子を 5 個、Th17 の分化メカニズムにおいて興味深い候補因子を 8 個の合計 13 個の候補因子を見出した (図 1)。



本年度は、Th17 細胞の分化および軟骨細胞分化に関わる miRNA (マイクロ RNA) を探索した。マウスナイーブ T 細胞を *in vitro* で Th17 細胞に分化誘導し、マイクロアレイ解析にて発現が変動する miRNA を探索した。この解析により、Th17 細胞の分化に関わると考えられる miRNA を複数同定した。

また、軟骨分化に関わる miRNA をプロファイリングすることを目的として、マウス胎生 15.5 日胚の肋軟骨由来の培養軟骨細胞に、軟骨分化において重要な転写因子である Sox9 をアデノウィルス感染により強発現させて RNA を抽出し、同様にマイクロアレイ解析を行った。この結果、3 個の miRNA が Sox9 の強発現により発現が増加

した。これらの候補 miRNA のうち、候補 miR-1 に注目し、以下の解析を行った。

まず、ヒト膝関節由来の軟骨細胞と未分化なヒト間葉系幹細胞 (Mesenchymal stem cells: MSC) における候補 miRNAs の発現を定量 PCR により解析を行った結果、MSC に比べ軟骨細胞において、発現が高いことを確認した。また MSC 軟骨分化誘導により候補 miRNAs の発現が増加することが観察された。これらの結果は、候補 miR-1 が軟骨分化に関わる miRNA であることを強く示唆する。

次に、変形性関節症 (OA) 患者の膝軟骨における候補 miRNAs の発現について検討したところ、候補 miRNAs は OA 患者群で有意に発現が低下する傾向を示した (図 2)。さらに、ヒト軟骨初代培養細胞に炎症性サイトカインである IL-1 β を加えて培養する *in vitro* OA モデルで候補 miRNAs の発現を調べたところ、候補 miRNAs の発現は有意に低下した。これらの結果は、候補 miRNAs が OA の病態に関わる miRNA であることを強く示唆する。

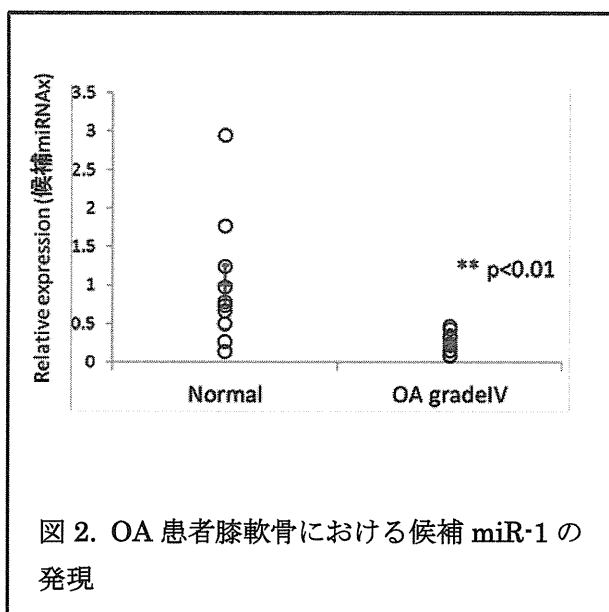


図 2. OA 患者膝軟骨における候補 miR-1 の発現

D. 考察

本研究では、これまでに IL-17 の発現制御因子を探索するため、IL-17 のレポーター・プラスミドと約 6000 個の cDNA ライブラリを使用したハイスループット遺伝子導入スクリーニングと、Th2 と Th17 のマイクロアレイデータ解析を組み合わせた一次スクリーニングを行い、その後、IL-4、IFN γ のレポーター・プラスミドを用いた

二次スクリーニング、遺伝子データベース等の情報を活用した解析を行い、アレルギー疾患、自己免疫疾患の新たな創薬ターゲットとして 13 個の新規 IL-17 の発現制御因子候補を見出した。これらの IL-17 制御因子候補は、有力な IL-17 制御因子候補であることから、有望な自己免疫疾患の創薬ターゲットである。

また、本年度は Th17 細胞の分化に関わると考えられる miRNA をマイクロアレイ解析によりプロファイリングし、Th17 細胞分化で発現が変動する miRNA を同定した。近年、遺伝子の発現を転写後レベルで負に制御する miRNA は様々な疾患に関わることが示されてきており、疾患の複雑な遺伝子ネットワークを理解する上で重要な因子となっている。これらの個々の miRNA は Th17 細胞分化に重要な因子と考えられるため、アレルギー疾患、自己免疫疾患の病態に関わる可能性のある重要な創薬ターゲットである。今後、これらの IL-17 の発現制御因子候補および Th17 細胞分化で発現が変動する miRNA は、Th17 細胞分化にどのように関わるか、アレルギー疾患、自己免疫疾患の病態にどのように関わるかを詳細に解析し、病態に密接に関係することが確認できた因子については、疾患モデル動物を使用した遺伝子強制発現や発現抑制の研究を行い、治療効果を検討する。更に、ターゲット候補を標的とした化合物スクリーニングを行い、これら化合物は疾患モデルマウスにおいて治療効果を検討する。これらにより、アレルギー疾患、自己免疫疾患に対する新規治療法や診断法の開発を目指す。

また、一次スクリーニングで見出した 141 の候補因子は上記 13 の創薬ターゲットに劣ることのない IL-17 制御因子候補である。これらに対して、更なる解析により IL-17 制御因子であるかについて検討する。また、現時点では IL-17 の発現を増加させる候補因子のみを解析対象として選別しているが、発現を抑制する候補因子に関しても同様に解析を行い、同定する。これらに加え、本研究で見出した Th17 細胞の分化に関わると考えられる miRNA も含め、IL-17 の発現制御を中心とした Th17 細胞の分化メカニズム、分子ネットワークを包括的に解明することを試みる。これらの解析は自己免疫疾患の病態に重要な Th17 細胞の理解に繋がり、病態メカニズムの全容解明に繋がるものと考えられる。

また、本研究では培養軟骨細胞に Sox9 を強発

現させて発現が変動した miRNA を同定した。Sox9 は軟骨分化において重要な転写因子であることから、これらは軟骨分化に関わる miRNA であることが予想される。これまでに軟骨分化に関わる miRNA として miR-140 が同定されており、ヒト疾患サンプルおよびノックアウトマウスの詳細な解析により、変形性関節症 (OA) に関わることが報告されている (Miyaki S., et al., *Arthritis Rheum.* 2009; Miyaki S., et al., *Genes Dev.* 2010)。このことより、本研究で見出した軟骨分化に関わると考えられる miRNA も OA 等、関節の破壊を伴う疾患に関わる可能性が考えられ、OA 患者の軟骨細胞で発現を確認したところ、本研究で注目した候補 miRNA の発現は OA 患者で有意に発現が低下していた。今後、疾患モデル動物等を用いて、更なる解析を行い、それらをターゲットとする治療法について検討することで、新たな治療法、診断法の開発を目指す。

本研究では民間企業、大学、研究機関の官民共同による綿密な打ち合わせによりデザイン、実施された研究により、これまでに報告されていない新規の IL-17 制御因子候補を同定し、さらに Th17 細胞分化で発現が変動する miRNA を同定した。これらにより、これまでにない規模で IL-17 の発現制御を中心とした Th17 細胞の分化制御の分子ネットワークを解明する上で重要なデータが得られた。本研究で利用したハイスループット遺伝子導入アッセイは、これまでの既存の手法では困難な創薬ターゲットの選定を効率的かつスピーディーに決定することができる。このシステムは、今後の継続的かつ様々な運営/活用により、多くの疾患メカニズムの解明につながることを期待できると考えられる。

E. 結論

Th17 細胞で発現が変動する miRNA を網羅的に解析して同定した。このデータとハイスループット遺伝子導入アッセイシステムにより同定した IL-17 発現制御候補因子のデータを組み合わせることで、これまでには無い規模で IL-17 の発現制御を中心とした Th17 細胞の分化制御の分子ネットワークを解明する上で重要なデータが得られた。

また、Sox9 を強発現させた培養軟骨細胞で発現が変動する miRNA を網羅的に解析し、軟骨分化に関わると考えられる miRNA を同定した。そのうち、一つの miRNA に注目して解析を行い、

この候補 miRNA が OA の病態に関わることを強く示唆する結果を得た。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

1. Matsui A, et al. The role of Wnt/ β -catenin signaling in Th17 cell differentiation. 第 21 回 Kyoto T Cell Conference, Kyoto, Japan. June 10-11, 2011.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

今後、スクリーニングで得られた遺伝子を創薬に応用する内容で特許の出願を予定している。

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

細胞培養弱毒生痘そうワクチンの安全性、有効性及び生産性に関する研究

所属 国立感染症研究所

研究者 倉根 一郎

研究期間 平成21年4月1日～平成24年3月31日

研究要旨：

本研究班においては、危機管理対策として国家備蓄されている細胞培養弱毒生痘そうワクチンを非特定の国民への緊急及び予防的使用を行う場合を想定して、その安全性と有効性を検証するための動物を用いた評価系確立、及び臨床疫学研究における有効性の評価系などを構築しデータを蓄積する研究がなされた。また、ワクチンの備蓄保存は長期になることが予想されるため、保存安定性データを取得するとともに、長期保存における安全性、有効性を確認するための動物試験又は物理化学的試験の評価系を構築しデータを蓄積するための研究がなされた。さらに、弱毒生痘そうワクチンの遺伝子解析などの特性解析、品質試験方法の精度向上のためのデータを蓄積するための研究がなされた。具体的には、1) 霊長類を含む動物モデルを用いた高度弱毒天然痘ワクチン LC16m8 の有効性と安全性に関する研究、2) 同ワクチンが実際にヒトにおいて使用された場合における有効性と安全性に関する研究、3) 同ワクチン製剤の生産性の向上に関する研究、の大きな3項目の研究がなされた。これらの研究成果は、我が国におけるバイオテロリズム対策に科学的基盤を提供するとともに、痘そうワクチンの安定的生産体制の維持と生産性向上を達成することに貢献する。

研究分担者

- ① 国立感染症研究所
西條政幸，森川茂，永田典代
- ② 国立保健医療科学院政策科学部
金谷泰宏
- ③ 慶應義塾大学医学部
齋藤智也（H21年4月～H23年3月）
- ④ 自衛隊中央病院
藤井達也
- ⑤ 一般財団法人化学及血清療法研究所
大隈邦夫，横手公幸

A. 研究目的

細胞培養弱毒生痘そうワクチンは危機管理対策のひとつとして国家備蓄されている。非特定の国民への緊急及び予防的使用を想定し安全性、有効性の検証のために動物を用いた評価系、及び臨床疫学研究における有効性の評価系などを構築しデータ、ワクチンの長期備蓄保存のための保存安定性データ、長期保存における

安全性と有効性の解析データ、弱毒生痘そうワクチンの遺伝子解析などの特性解析、品質試験方法の精度向上のためのデータ、ワクチン製造施設の他製剤との共用の可能性を検討し、製造施設の稼働効率を高めること等で安定生産体制の維持と生産性向上を達成するためのデータを蓄積することが本研究班に与えられた目的である。

B. 研究方法

- 1) 細胞培養弱毒生痘そうワクチンの長期保管による天然痘発症予防効果の変化および曝露後予防接種時の接種部位の皮膚病変に関する研究。

製造されてから長期（約7年9ヶ月）保管されていた高度弱毒痘そうワクチン LC16m8 の霊長類におけるサル痘発症予防効果を、Lister 株接種個体と比較して評価した。また、霊長類（カニクイザル）に高度弱毒化痘そうワクチン LC16m8 接種による免疫誘導時にお

ける EEV 関連蛋白 (F13L, A33R, A34R, A36R, B5R) に対する免疫誘導能を, LC16m8 株の親株である Lister 株によるそれと比較して検討した. さらに, 天然痘の原因ウイルスである痘瘡ウイルスに感染してから天然痘ワクチンを接種することにより, 天然痘の発症予防または軽症化が期待されることから, サル痘ウイルス感染個体に LC16m8 ワクチン接種部位への影響を評価した.

2) 長期保管に伴う検討, 品質試験法改善検討, 生産性向上検討及び生物基準等見直しに関する研究.

国家備蓄されている乾燥細胞培養痘そうワクチンについて, ワクチンの 72 箇月目までの長期保管における安定性 (力価及び含湿度) を評価した. また, マウス神経毒力試験を実施し, 長期保管後の安全性の確認を行った. さらに, 原液の 36 箇月目までの長期保管における安定性評価を行った. 添加剤については, 9 年間冷蔵保管した検体で毒性等の変化の有無を評価した. 薬事法等の規制見直しによる製造設備の他製剤との共用化の可能性を検討した. 品質試験検体に影響を及ぼす可能性のあるロット内均一性を評価するため, 凍結乾燥時の棚間における力価及び含湿度を比較検討した.

3) LC16m8 の臨床評価に関する研究.

LC16m8 のこれら既存免疫に与える影響について Protein Chip により解析を行った. 種痘歴を踏まえ, 対象を出生年で A 群 (1976 年～), B 群 (1970 年～1975 年), C 群 (1964 年～1998 年), D 群 (1963 年～) の 4 群に分類し, Protein Chip による蛍光強度により抗体プロファイルを解析した.

4) 鼻腔内サル痘ウイルス感染霊長類モデルにおける末梢血液からのウイルス分離と LC16m8 曝露後接種サル痘発症予防効果の関連に関する解析.

高度弱毒生痘そうワクチン LC16m8 株 (以下, LC16m8) 暴露後接種のサル痘ウイルス感染症発症予防効果を, 霊長類におけるサル痘ウイルス鼻腔内接種感染モデルを用いて解析した. ワクチン非接種群 (コントロール群, 6 頭), サル痘ウイルス感染 (10^7 pfu) 後 15 分後に LC16m8 接種を行った群 (D0-ワクチン接種群, 6 頭), および, サル痘ウイルス感染後 24 時間

後に LC16m8 接種を行った群 (D1-ワクチン接種群, 6 頭) の臨床症状, 予後, ウイルス血症レベル, 抗体応答を調べた.

5) 細胞培養弱毒生痘そうワクチンの疫学的有効性及び安全性評価に関する研究.

LC16m8 ワクチンを接種された健康成人 (LC16m8 の接種を受けた自衛隊員) のデータから, 安全性と有効性の解析を実施した. また, LC16m8 ワクチン接種者における vaccinia virus に対する獲得免疫を中和抗体測定法を用いて解析した.

6) 劇症型サル痘発症機序の解明に関する研究.

劇症型サル痘の発症機序を明らかにする目的で, サル痘ウイルス実験的感染カニクイザルの臨床症状, 免疫反応, 病理学的変化を検討した.

7) 細胞培養痘そうワクチンの遺伝的安定性に関する研究.

増殖温度感受性や低神経病原性に関与する遺伝子あるいはその変異等を明らかにするため Lister 株の遺伝子による LC16mO 株の温度感受性相補試験を実施した.

8) 動物モデルを用いた痘そうワクチンの安全性及び有効性に関する基礎的研究.

細胞培養弱毒生痘そうワクチン LC16m8 の安全性並びに有効性の検証のために, 動物を用いた評価系を構築しデータ取得を行った. 安全性評価については, 添付文書上の接種不適合又は要注意接種対象となっている免疫機能障害者または免疫抑制をきたす治療を受けている者に対する LC16m8 の安全性評価を想定して, 免疫不全サルモデルを用いて検討した. 有効性評価については, 天然痘患者の発生が認められていた 1970 年代と現在の痘そうワクチンの使用目的や状況を比較分析した. 接種回数異なること及びその調査研究がほとんど行われていないことに注目し, マウスを用いたワクチン接種回数 (国内外のワクチン株の組合せ接種含む) と免疫賦活効果に関する調査を実施した. LC16m8 により誘導された抗体が認識する抗原タンパク群の軽時的な変化を調査するために, ワクチニアウイルス WR 株の 95% 以上の構成タンパクを網羅する Proteome Microarray Chip を用いたプロテオミク解析を実施した.

【倫理面への配慮】

本研究班で実施されたヒトを対象とした臨床的研究、動物が用いられた実験の全てが、各の施設における関連委員会（倫理、動物実験）への申請と承認を得た上で実施されていた。

C.研究結果

1) 細胞培養弱毒生痘そうワクチンの長期保管による天然痘発症予防効果の変化および曝露後予防接種時の接種部位の皮膚病変に関する研究。

少なくとも7年9ヶ月間保管されていたLC16m8のウイルス感染価は低下しないことが確認されていたが、霊長類におけるサル痘発症予防効果を有することも確認された。Lister株免疫個体では、EEV関連蛋白全てに抗体誘導が確認されたが、LC16m8個体ではA34RおよびB5Rに対する免疫応答は弱く、特にB5Rに対しては有意な抗体応答が認められた個体はなかった。曝露後予防効果を期待してLC16m8を接種した個体におけるワクチン接種部位の病変は、サル痘ウイルス非感染個体にワクチン接種した時にみられる病変と比較して重症の個体が存在したものの、多くは非感染個体のそれとほぼ同様であった。

2) 長期保管に伴う検討、品質試験法改善検討、生産性向上検討及び生物基準等見直しに関する研究。

乾燥細胞培養痘そうワクチンは、製造後72ヶ月目まで力価及び含湿度を保持していることが確認された。また、マウス神経毒力試験を実施し、長期保管後の安全性が担保されていることも確認された。原液の長期保管における安定性評価を行い、36ヶ月目まで安定であることが確認された。さらに添加剤についても検討し、9年間冷蔵保管した検体で毒性等の変化は認められず、安定性が認められた。薬事法等の規制見直しによる製造設備の他製剤との共用化の可能性を検討し、生物基準及び検定基準等、品質の確認において実状に合った内容に見直し、整備していく必要があると考えられた。凍結乾燥時の棚間における力価及び含湿度を比較検討したが、製造位置によって大きな変動がないことが確認された。

3) LC16m8の臨床評価に関する研究。

対象を出生年でA群(1976年～)、B群(1970年～1975年)、C群(1964年～1998年)、D群(1963年～)の4群に分類し、Protein Chipによる蛍光強度により抗体プロファイルを解析した。この結果、種痘前の血清に関して、B群ではWR148などの6抗原、C群ではWR148、D13Lなどの8抗原、D群ではWR148、I1Lなどの10抗原にシグナルが確認された。一方、LC16m8接種後の血清では、初免疫のA群においてWR148、D13L、D8L、A13L、A10L、A27L、I1Lの7抗原が陽転し、B群でD13Lなどの7抗原、C群で12抗原、D群で8抗原に対するシグナルの有意な増強が認められた。過去のワクチン接種回数が多いC-D群において、シグナル強度の強さ、ならびに抗原数の両者に関し、より強い免疫応答が認められた。

4) 鼻腔内サル痘ウイルス感染霊長類モデルにおける末梢血液からのウイルス分離とLC16m8曝露後接種サル痘発症予防効果の関連に関する解析。

コントロール群、D0-ワクチン群、D1-ワクチン群では、それぞれ1頭、2頭、2頭が致死感染を呈した。臨床症状や血液からのウイルス分離検査、病理学的解析結果から、LC16m8の暴露後ワクチン接種による霊長類におけるサル痘発症予防効果を確認することはできなかった。生存例の多くは感染後11日目の血液からサル痘ウイルスは分離されず、一方、死亡例の全てで感染後14日目の血液から同ウイルスが分離された。曝露後LC16m8の霊長類におけるサル痘発症予防または軽症化のためには、サル痘ウイルス感染後14日目にはウイルス分離陰性になる程度の免疫を誘導しなければならないと考えられた。

5) 細胞培養弱毒生痘そうワクチンの疫学的有効性及び安全性評価に関する研究。

胸部X線の異常や脳炎や副種・種痘疹などの重篤な有害事象の報告はなく、血圧および臨床検査においても接種前後で有意な変動は認めなかった。善感例129例において報告された種痘後の局所所見では、水疱100(78%)、潰瘍12(9%)、痂皮40(31%)、腫脹19(15%)であった(重複あり)。平均発赤径は23.8mm、平均水疱径は7.6mmであった。副反応の発現率は、初回接種群では27.0%、再種痘群では

5.6%と前者で有意に高かったが、逆に善感率は、初種痘群で94.4%、再種痘群で81.7%と初種痘群で有意に高かった。副反応の種類としては、リンパ節腫脹(19.4%)、接種部紅斑(5.2%)の報告が比較的高頻度にみられ、その他、発熱(1.5%)、倦怠感(0.7%)、サテライト(0.7%)、発疹(0.4%)、接種部腫脹(0.4%)、自家接種(0.4%)などが報告された。中和抗体に関する調査では、初回接種群が再接種群と比較して抗体上昇がより顕著であった。善感反応と中和抗体陽転率には強い相関を認めた。発赤径(局所所見)が10mmを超える群では、10mm未満の群と比較して、中和抗体価は有意に高かった。健康成人への接種においても高い抗体陽転率を示した。副反応についても、従来の第1世代痘そうワクチンよりも高い安全性のプロファイルを示した。

6) 劇症型サル痘発症機序の解明。

サル痘ウイルス感染・増殖細胞はマクロファージ、サイトケラチン陽性の上皮細胞であった。また、重症例(劇症例)となった個体は共通して免疫不全状態に陥っていることが明らかとなった。

7) 細胞培養痘そうワクチンの遺伝的安定性に関する研究。

温度感受性は *B5R* 遺伝子以外にウイルス DNA の *HindIII*-A 断片にある複数の遺伝子の変異・欠失によることが分かった。これまでに LC16mO / 8 株の *A56R* 遺伝子の 15 塩基欠失が部分的に温度感受性に関与することが同定されたが、さらに *A36R*, *A53R*, *A55R* 遺伝子の変異が関与する可能性が示唆された。そこで、これらの遺伝子を組換えたワクシニアウイルスを容易に作成できるシステムを確立した。

8) 動物モデルを用いた痘そうワクチンの安全性及び有効性に関する基礎的研究。

安全性評価において、乾燥細胞培養痘そうワクチン LC16m8 は、人為的に作出した免疫不全サルモデルで評価した結果、副反応の出現がなく、安全に使用可能なワクチンであることが確認された。有効性評価において、痘そうワクチンの接種回数と免疫賦活効果の関連性を調査した結果、中和抗体産生を指標とすると最も効果的な接種回数は2回であった。また、痘そうワクチンを

2回接種する場合、Lister や NYCBH 株の痘そうワクチンに対して LC16m8 を事前接種すると、それらの有効性を維持したまま、安全面でのリスクを低減できる可能性が示唆された。ワクチンによる免疫効果の持続について評価し、単回接種後1.5年まで防御効果と中和抗体価が持続することを明らかにしたが、接種後1年目以降は、LC16m8 及び Lister 接種群において致死量の WR 攻撃に対して軽度の症状(毛並みの乱れ)が認められ、抗 WR 中和抗体価にも若干減少傾向が認められることを明らかにした。接種後1.5年目では LC16m8 及び Lister 接種群が共通で陽性率100%を示す抗原は防御や中和に重要な抗原を含む9種類であった。これらの抗原の反応強度は接種後1年目の反応強度より概ね10分の1以下に低下しており、このことが1.5年目に認められた病原ウイルス攻撃後の軽微な発症や中和抗体価低下に起因していると考えられた。

D. 考察

1) LC16m8 株の有効性と副作用に関する研究。

霊長類を用いた研究により、少なくとも7年9ヶ月間保管されていた LC16m8 のウイルス感染価は低下しないことが確認され、霊長類におけるサル痘発症予防効果が維持されていることが確認された。また、LC16m8 株の効果は *B5R* に対する抗体誘導能が欠損または低下していても得られるものであることが明らかにされた。さらに、ヒトにおいてサル痘ウイルスや痘瘡ウイルスに感染した後、曝露後接種目的で天然痘ワクチン LC16m8 を安全に接種することが可能であることも示唆された。痘そうワクチン LC16m8 は、人為的に作出した免疫不全サルモデルで評価した結果、副反応の出現がなく、安全に使用可能なワクチンであることが確認された。

有効性評価において、痘そうワクチンの接種回数と免疫賦活効果の関連性を調査した結果、中和抗体産生を指標とすると最も効果的な接種回数は2回であった。また、痘そうワクチンを2回接種する場合、Lister や NYCBH 株の痘そうワクチンに対して LC16m8 を事前接種すると、それらの有効性を維持したまま、安全面でのリスクを低減できる可能性が示唆された。しかし、LC16m8 接種、1年目以降の防御効果及び中和

抗体価が低下し、その原因に関連する抗原群を調査した。接種後 1.5 年目では LC16m8 及び *Lister* 接種群が共通で陽性率 100%を示す抗原は防御や中和に重要な抗原を含む 9 種類であったが、これらの抗原の反応強度は接種後 1 年目の反応強度より概ね 10 分の 1 以下に低下していた。このことが 1.5 年目に認められた病原ウイルス攻撃後の軽微な発症や中和抗体価低下に起因していると考えられた。ただし、病原ウイルス攻撃に応答して、接種後 1 年目までに認識された防御や中和に重要な抗原に対する反応強度が著しく上昇し、症状の重症化が阻止されたことから、ワクチン接種により獲得された免疫が確実に記憶されていることが示唆された。

2) LC16m8 の性状解析に関する研究。

これまでの解析から、LC16mO 株では温度感受性のリバータントは極めて生じにくいこと、隣接しない 2 箇所の *Lister* 株の遺伝子領域により LC16mO 株の温度感受性が相補されることから、2 遺伝子以上が温度感受性に関与していると考えられている。これまでの研究及び今回の結果から、温度感受性には A56R 遺伝子内の部分欠失以外に、*HindIII*-A 断片に含まれる A36R, A53R, A55R 遺伝子の変異が温度感受性責任変異の可能性が示唆された。

3) 同ワクチンが実際にヒトにおいて使用された場合における有効性と安全性に関する研究。

LC16m8 ワクチンは、一部では *Lister* 株に比し免疫原性に劣るという報告もあるが、安全性に優れ、獲得抗体の持続や他の pox virus に対しても有効であることから、sub-clinical な免疫不全者が接種対象に含まれるような集団に対する初種痘としても有用であり、種々の状況を勘案すれば第一に選択されるべき弱毒生痘そうワクチンであると結論される。

LC16m8 は現在第 3 世代に分類され、その安全性の高さから世界的に評価されている。米国では第 2 世代である ACAM2000 株の接種後、免疫不全者接種後に進行性ワクシニアに至った例や、被接種者からの直接接触により副次伝播（播種）した例が報告されており、国内における副反応のモニターも継続する

必要がある。LC16m8 の安全性を総括する際には、被接種者は約 5,000 名といまだ結論するに十分な数ではないこと、主に海外派遣を控えた健全自衛官が対象であることによる副反応報告までの閾値やアクセスの問題（過小評価されやすいこと）、そしていわゆる“Healthy warrior effect”などは考慮されるべきであろう。LC16m8 ワクチンの国際的な位置づけや運用方法を明確化する必要がある。ワクチンの備蓄や接種までのロジスティクス、迅速な封じ込め策の他に、実際の天然痘の流行時や重篤な副反応出現時の治療薬となりうる抗ウイルス薬や VIG (vaccinia immune globulin) に関しても、今後の重要な課題の一つである。

4) 同ワクチン製剤の生産性の向上に関する研究。

乾燥細胞培養痘そうワクチンは、生物基準に規定されている -20°C 以下で保存した場合、保管後 108 箇月目まで有効性分等に変化が認められず、安定であることが示された。

ワクチン原液の安定性試験において、-80°C で保管する場合、保管後 108 箇月目までは毒性等に影響がないことが確認された。

国家備蓄品としてさらに長期にわたる保管を行うことを想定し、安全性、有効性を評価する追加試験の検討等を今後も継続する必要があると考えられる。

痘そうワクチンに関わる薬事法等の規制見直しにより、薬局等構造設備規則の製造設備の専用化解除及び感染研病原体等安全管理規定の BSL 分類が改定され、ワクチン原液製造施設及び製剤化製造施設の他製剤との共用化の可能性が示されたことにより、生産性向上に寄与できるものと考えられる。

マーカー試験における発育鶏卵法に代わる細胞培養法の検討、中型プラーク含有率測定試験における VeroE6 細胞を用いた限度試験への変更の可能性について検討を開始し、品質管理試験の精度向上を目指す必要がある。品質試験における安定性試験は、製造法の恒常性の向上、長期安定性データによる有効期間内の品質の担保等により、その必要性は薄いと考えられた。生物基準の見直しでは、最終バルクの試験からマーカー試験を削除、

原液の試験としてマーカー試験を追加し、さらに検定基準の中間段階の試験を最終バルクから原液に改訂する必要があると判断された。

E. 結論

細胞培養弱毒生痘そうワクチン LC16m8 の遺伝的安定性、動物実験における有効性と副作用（接種部位病変）がより詳細に明らかにされた。重症天然痘モデルとしての劇症型サル痘の病態を病理学的解析により明らかにされた。また、生産性の向上と国家検定のあり方への提言がなされた。さらに、LC16m8 を接種されたヒトにおけるワクチニアウイルスの各抗原に対する抗体応答が解析され、安全性と有効性についても調査された。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Saito T, Fujii T, Kanatani Y, Saijo M, Morikawa S, Yokote H, Takeuchi T, Kuwabara N. Clinical and Immunological Response to Attenuated Tissue-Cultured Smallpox Vaccine LC16m8. *JAMA* 301:1-10, 2009
- 2) Iizuka I, Saijo M, Shiota T, Ami Y, Suzaki Y, Nagata N, Hasegawa H, Sakai K, Fukushi S, Mizutani T, Ogawa M, Nakauchi M, Kurane I, Mizuguchi M, Morikawa S. Loop-mediated isothermal amplification-based diagnostic assay for monkeypox virus infections. *Journal of Medical Virology* 80:1102-1108, 2009
- 3) Saijo M, Ami Y, Suzaki Y, Nagata N, Iwata N, Hasegawa H, Iizuka I, Shiota T, Sakai K, Ogata M, Fukushi S, Mizutani T, Sata T, Kurata T, Kurane I, Morikawa S. Virulence and pathophysiology of the Congo Basin and West African strains of monkeypox virus in nonhuman primates. *Journal of General Virology* 90:2266-2271, 2009
- 4) Saijo M. Emerging and re-emerging infection threats to society. *Journal of Disaster Research* 4:291-297, 2009
- 5) Saijo, M., Morikawa, S., Kurane, I. :Diagnostic systems for viral hemorrhagic fevers and emerging viral infections prepared in the National Institute of Infectious Diseases. *Journal of Disaster Research* 4:315-321, 2009
- 6) Morimoto K, Saijo M. Imported rabies cases and preparedness for rabies in Japan. *Journal of Disaster Research* 4:346-357, 2009
- 7) Saijo M, Morikawa S, Kurane I. Recent progress in the treatment for Crimean-Congo hemorrhagic fever and future perspectives. *Future Virology* 5:801-809, 2010
- 8) Nakayama E, Yokoyama A, Miyamoto H, Igarashi M, Kishida N, Matuno K, Marzi A, Feldmann H, Ito K, Saijo M, Takada A. Enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of filovirus species-specific antibodies. *Clinical and Vaccine Immunology* 17:1723-1728, 2010
- 9) 西條政幸：アレナウイルス。日本臨床 68（増刊号）:431-434, 2010
- 10) 西條政幸：南米出血熱の診断法の概要。日本医事新報 4495: 83-84, 2010
- 11) Watanabe S, Maeda K, Suzuki K, Ueda N, Iha K, Taniguchi S, Shimoda H, Kato K, Yoshikawa Y, Morikawa S, Kurane I, Akashi H, Mizutani T. Novel betaherpesvirus in bats. *Emerging Infectious Diseases* 16:986-988, 2010
- 12) Ohkuma K, Shinmura Y. Threats from Smallpox and Smallpox Vaccines. *Sci. Rep. Chemo-Sero-Therap Res Inst* 19: 22-42, 2010
- 13) Watanabe S, Masangkay JS, Nagata N, Morikawa S, Mizutani T, Fukushi S, Alviola P, Omatsu T, Ueda N, Iha K, Taniguchi S, Fujii H, Tsuda S, Endoh M, Kato K, Tohya Y, Kyuwa S, Yoshikawa Y, Akashi H. Bat coronaviruses and experimental infection of bats, the Philippines. *Emerging Infectious Diseases* 16:1217-1223, 2010
- 14) Johnson BF, Kanatani Y, Fujii T, Saito T, Yokote H, Smith GL. Serological responses in humans to the smallpox vaccine LC16m8. *Journal of General Virology* 92:2405-2410, 2011
- 15) Kennedy JS, Gurwith M, Dekker C, Frey SE, Edwards KM, Kenner J, Lock M, Empig C, Morikawa S, Saijo M, Yokote H, Karem K, Damon I, Perlroth M, Greenberg RN. Safety and immunogenicity of LC16m8, an attenuated smallpox vaccine in vaccinia-naive adults. *Journal of Infectious Diseases* 204:1395-1402, 2011
- 16) Gordon SN, Cecchinato V, Andresen V, Heraud JM, Hryniewicz A, Parks RW, Venzon D, Chung

HK, Karpova T, McNally J, Silvera P, Reimann KA, Matsui H, Kanehara T, Shinmura Y, Yokote H, Franchini G. Smallpox vaccine safety in dependent on T cells and not B cells. *Journal of Infectious Diseases* 203:1043-1053, 2011

17) Ogawa H, Miyamoto H, Ebihara H, Ito K, Morikawa S, Feldmann H, Takada A. Detection of all known filovirus species by reverse transcription-polymerase chain reaction using a primer set specific for the viral nucleoprotein gene. *Journal of Virological Methods* 171:310-313, 2011

18) Fukushi S, Nakauchi M, Mizutani T, Saijo M, Kurane I, Morikawa S. Antigen-capture ELISA for the detection of Rift Valley fever virus nucleoprotein using new monoclonal antibodies. *Journal of Virological Methods* 180:68-74, 2012

19) Arai S, Gu SH, Baek LJ, Tabara K, Bennett SN, Oh HS, Takada N, Kang HJ, Tanaka-Taya K, Morikawa S, Okabe N, Yanagihara R, Song JW. Divergent ancestral lineages of newfound hantaviruses harbored by phylogenetically related crocidurine shrew species in Korea. *Virology (in press)*

20) Tani H, Morikawa S, Matsuura Y. Development and applications of VSV vectors based on cell tropism. *Frontiers in Microbiology* 2: 1-7, 2012

21) Shirato K, Maeda K, Tsuda S, Suzuki K, Watanabe S, Shimoda H, Ueda N, Iha K, Taniguchi S, Kyuwa S, Endoh D, Matsuyama S, Kurane I, Saijo M, Morikawa S, Yoshikawa Y, Akashi H, Mizutani T. Detection of bat coronaviruses from *Miniopterus fuliginosus* in Japan. *Virus Genes* 44:40-44, 2012

22) Taniguchi S, Watanabe S, Masangkay JS, Omatsu T, Ikegami T, Alviola P, Ueda N, Iha K, Fujii H, Ishii Y, Fukushi S, Saijo M, Kurane I, Kyuwa S, Akashi H, Yoshikawa Y, Shigeru Morikawa, S. Reston Ebola Virus Antibodies in Bats, the Philippines. *Emerging Infectious Diseases* 17:1559-1560, 2011

23) Abe M, Ito N, Sakai K, Kaku Y, Oba M, Nishimura M, Kurane I, Saijo M, Morikawa S, Sugiyama M, Mizutani T. A novel sapelovirus-like virus isolation from wild boar. *Virus Genes* 43:243-248, 2011

2. 学会発表

1) 永井千草, 新村靖彦, 佐藤梓, 金原知美, 松井元, 横手公幸, 志垣隆通, 千北一興, 大隈邦夫, 岡徹也, 橋爪壯. 動物モデルを用いた細胞培養痘そうワクチンLC16m8の接種回数に関する検討. 第13回日本ワクチン学会学術集会, 札幌 (2009.09)

2) Yokote H, Shinmura Y, Kanehara T, Satou A, Nagai C, Matsui H, Chigita K, Ohkuma K, Miyamoto S, Funatsu A, Saijo M, Morikawa S, Kurane I, Hashizume S. LC16m8, an attenuated smallpox vaccine will become an effective countermeasure against bio-terrorism with smallpox virus throughout the world. 38th Congress on Military Medicine. KUALA LUMPUR, Malaysia (2009.10)

3) 新村靖彦, 永井千草, 佐藤梓, 金原知美, 松井元, 横手公幸, 千北一興, 大隈邦夫, 宮本誠二, 橋爪壯. ワクチニアウイルス感染により誘導される生体防御機構の解析. 第57回日本ウイルス学会学術集会, 東京 (2009.10)

4) Bukbuk DN, Saijo M, Georges-Courbot MC, Marianneau P, George A, Shuetsu F, Mizutani T, Kurata T, Kurane I, Morikawa S. Recombinant nucleocapsid protein-based diagnosis of and seroepidemiological study on Lassa fever. The 109th ASM General Meeting, Philadelphia, PA (2009.05)

5) Saijo M, Ami Y, Suzaki Y, Nagata N, Iwata N, Hasegawa H, Ogata M, Iizuka I, Shiota T, Fukushi S, Mizutani T, Sata T, Kurata T, Kurane I, Morikawa S. Pathology of monkeypox in nonhuman primates leading to the difference in virulence between Gongo Basin and West African strains. 43rd Annual Meeting of the US-Japan Cooperative Medical Science Program and Special Minisymposium on enterovirus 71, Philadelphia, PA (2009.07)

6) 西條政幸, 網至康, 須崎百合子, 永田典代, 長谷川秀樹, 新村靖彦, 横手公幸, 飯塚愛恵, 塩田智之, 佐多徹太郎, 倉田毅, 倉根一郎, 森川茂. 痘そうワクチンLC16m8およびLister株免疫時におけるIMVおよびEEV蛋白に対する抗体応答とサル痘予防効果. 第13回日本ワクチン学会学術総会, 札幌 (2009.09)

- 7) 飯塚愛恵, 塩田智之, 西條政幸, 福士秀悦, 水谷哲也, 緒方もも子, 倉根一郎, 水口雅, 森川茂. 痘そうワクチンLC16m8株の温度感受性に関する解析. 第57回日本ウイルス学会学術集会, 東京 (2009.10)
- 8) 西條政幸, 網康至, 須崎百合子, 塩田智之, 飯塚愛恵, 永田典代, 岩田奈織子, 長谷川秀樹, 緒方もも子, 福士秀悦, 水谷哲也, 倉根一郎, 佐多徹太郎, 倉田毅, 森川茂. コンゴ盆地型および西アフリカ型サル痘ウイルスの臓器親和性と病原性. 第57回日本ウイルス学会学術集会, 東京 (2009.10)
- 9) Yokote H, Shinmura Y, Kanehara T, Satou A, Nagai C, Matsui H, Ohkuma K, Chigita K, Miyamoto S, Funatsu A, Saijo M, Morikawa S, Kurane I, Hashizume S. Prevacination of LC16m8 Alleviated the Skin Lesions Caused by Conventional Smallpox Vaccines without Any Interference with Vaccine-elicited Immune Responses. 2010 ASM Biodefense Research Meeting, Baltimore, USA (2010.02)
- 10) Kanehara T, Shinmura Y, Satou A, Nagai C, Matsui H, Yokote H, Ohkuma K, Chigita K, Miyamoto S, Funatsu A, Saito T, Saijo M, Morikawa S, Kurane I, Hashizume S. LC16m8, an attenuated smallpox vaccine will be a useful countermeasure against bio-terrorism with smallpox. 2010 ASM Biodefense Research Meeting, Baltimore, USA (2010.02)
- 11) 永井千草, 新村靖彦, 佐藤梓, 金原知美, 松井元, 丸野真一, 横手公幸, 志垣隆通, 大隈邦夫, 宮本誠二, 橋爪壯. ワクチニアウイルス株間の交差免疫誘導能を評価する動物モデルの検討. 第58回日本ウイルス学会学術集会, 徳島 (2010.11)
- 12) 木下一美, 酒井宏治, 永田典代, 王麗欣, 伊藤(高山)睦代, 中道一生, 森川茂, 倉根一郎, 西條政幸. リンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス核蛋白の単クローン抗体を用いた診断法の開発. 第58回日本ウイルス学会学術集会, 徳島 (2010.11)
- 13) 新倉綾, 池上徹郎, 森川茂, 山田靖子, CJ Peters, 牧野伸治. リフトバレー熱ウイルスL蛋白のポリメラーゼ機能におけるロイシンジッパー様モチーフの重要性. 第58回日本ウイルス学会学術集会, 徳島 (2010.11)
- 14) 新井智, 永野昌博, 浅川満彦, 木村敏之, 近真理奈, 多屋馨子, 森川茂, 岡部信彦, Richard Yanagihara. Evolutionary insights from the genetic diversity of Asama virus in the Japanese shrew mole (*Urotrichus talpoides*). 第58回日本ウイルス学会学術集会, 徳島 (2010.11)
- 15) 永田典代, 岩田奈織子, 長谷川秀樹, 佐藤由子, 森川茂, 佐多徹太郎. SARS発症マウスモデルにおけるIFN- γ の投与効果. 第58回日本ウイルス学会学術集会, 徳島 (2010.11)
- 16) 渡辺俊平, Masangkay Joseph S, 永田典代, 森川茂, 水谷哲也, 福士秀悦, 大松勉, 上田直也, 伊波興一朗, 谷口怜, 藤井ひかる, 津田峻平, 加藤健太郎, 遠矢幸伸, 久和茂, 吉川泰弘, 明石博臣. フィリピンにおけるコウモリコロナウイルスの検出および飼育食果コウモリを用いたウイルス感染実験. 第58回日本ウイルス学会学術集会, 徳島 (2010.11)
- 17) 岩田奈織子, 永田典代, 辻隆裕, 長谷川秀樹, 佐藤由子, 横田恭子, 宇田晶彦, 水谷哲也, 西條政幸, 森川茂, 佐多徹太郎. SARS-CoV感染動物モデルを用いたUV不活化SARS-CoVの副反応について. 第58回日本ウイルス学会学術集会, 徳島 (2010.11)
- 18) 酒井宏治, 田丸精治, 前田健, 永田典代, 網康至, 岩田奈織子, 鈴木忠樹, 水谷哲也, 福士秀悦, 須崎百合子, 緒方もも子, 長谷川秀樹, 西條政幸, 山田靖子, 倉根一郎, 森川茂. カニクイザルで致死的感染症を起こしたイヌジステンパーウイルスのサル及びイヌでの病原性の解析. 第58回日本ウイルス学会学術集会, 徳島 (2010.11)
- 19) 伊波興一朗, 中内美奈, 谷口怜, 福士秀悦, 水谷哲也, 緒方もも子, 西條政幸, 倉根一郎, 森川茂. アルゼンチン出血熱の実験室診断法の患者血清を用いた評価. 第58回日本ウイルス学会学術集会, 徳島 (2010.11)
- 20) 水谷哲也, 酒井宏治, 本道栄一, 福士秀悦, 緒方もも子, 西條政幸, 倉根一郎, 森川茂, 前田健. コウモリから分離された新規アデノウイルスのゲノム配列の決定および系統学的解析. 第58回日本ウイルス学会学術集会, 徳島 (2010.11)
- 21) 西條政幸, 福士秀悦, 水谷哲也, 緒方もも子, 倉根一郎, 森川茂. 3分節RNAの塩基配列に基

- づく中国新疆ウイグル自治区におけるクリミア・コンゴ出血熱ウイルスの分子疫学と進化. 第58回日本ウイルス学会学術集会, 徳島 (2010.11)
- 22) 酒井宏治, 永田典代, 網 康至, 岩田奈織子, 鈴木忠樹, 水谷哲也, 福士秀悦, 須崎百合子, 緒方もも子, 西條政幸, 長谷川秀樹, 山田靖子, 倉根一郎, 森川 茂. カニクイザルで致死感染症を起こしたイヌジステンパーウイルスの性状と実験感染サルでの病原性の解析. 第150回日本獣医学会, 帯広 (2010.09)
- 23) 谷口 怜, 佐山勇輔, 渡辺俊平, 飯塚愛恵, 福士秀悦, 水谷哲也, 石井寿幸, 久和茂, 明石博臣, 吉川泰弘, 森川茂, 倉根一郎. レストンエボラウイルス膜糖蛋白を標的とした抗体検出系の確立. 第150回日本獣医学会, 帯広 (2010.09)
- 24) 水谷哲也, 酒井宏治, 本道栄一, 福士秀悦, 緒方もも子, 西條政幸, 倉根一郎, 森川 茂, 前田 健. コウモリから分離された新規アデノウイルスの分子学的性状決定. 第150回日本獣医学会, 帯広 (2010.09)
- 25) Saijo, M., Fukushi, S., Mizutani, T., Kurane, I., Morikawa, S. Evolutional events of Crimean-Congo hemorrhagic fever viruses in Xinjinag, China, assessed with 3 segmented RNA genes. 44th US-Japan Cooperative Medical Science, Viral Diseases Panel Meeting, Sapporo, Japan (2010.06)
- 26) Saijo, M. Molecular epidemiology on Crimean-Congo hemorrhagic fever virus infections based on the 3 segmented RNA genes. BIT's 1st World Congress of Virus and Infections-2010, Busan, Korea (2010.07)
- 27) 江藤亜紀子, 高橋邦彦, 玉置洋, 金谷泰宏. 生物テロに向けた天然痘ワクチンの有効性評価について. 第5回保健医療科学研究会, 埼玉県和光市 (2011. 12)
- 28) Saijo M, Ami Y, Suzaki Y, Nagata N, Yoshikawa (Iwata) N, Hasegawa H, Fukushi S, Mizutani T, Sata T, Kurane I, Morikawa S. Immune responses against EEV and IMV in non-human primates infected with monkeypox virus or vaccinated with a highly attenuated smallpox vaccine LC16m8 and protection from lethal monkeypox. XV International Congress of Virology, Sapporo, Japan (2011.09)
- 29) Nagata N, Iwata N, Hasegawa H, Sato Y, Morikawa S, Sata T. Interferon gamma protects adult balb/c mice from lethal respiratory illness after mouse-adapted SARS-CoV infection. XV International Congress of Virology, Sapporo, Japan (2011.09)
- 30) Morikawa S, Sayama Y, Taniguchi S, Fukushi S, Kurane I, Saijo M. Serological survey of Reston ebolavirus infection in the Philippines. 45th Joint Working Conference on Immunology and Viral Disease, Stanford USA, 2011 June 20-22
- 31) 岡本宗裕, 小野文子, 藤本浩二, 高野淳一朗, 濱野正敬, 森川茂, 永田典代, 水谷哲也, 酒井宏治, 堀井俊宏, 中屋隆明, 中村昇太, 宮沢孝幸, 松井淳. ニホンザル血小板減少症の原因ウイルスの同定. 第152回日本獣医学会学術集会, 大阪 (2011年9月)
- 32) 酒井宏治, 永田典代, 水谷哲也, 網康至, 吉河 (岩田) 奈織子, 長谷川秀樹, 福士秀悦, 西條政幸, 竹田誠, 森川茂. カニクイザルから分離した新しいサルアデノウイルスの性状解析. 第152回日本獣医学会学術集会, 大阪 (2011年9月)
- 33) Lim CK, Ami Y, Fujii Y, Moi ML, Kitaura K, Kotaki A, Morikawa S, Saijo M, Suzuki R, Kurane I, Takasaki T. Pathogenesis of epidemic chikungunya virus in nonhuman primates. XV International Congress of Virology, Sapporo, Japan (2011.09)
- 34) Iha K, Nakauchi-Hori M, Taniguchi S, Fukushi S, Mizutani T, Ogata M, Kyuwa S, Saijo M, Romanowski V, Enria DA, Morikawa S. Establishment of serological diagnosis of Argentine hemorrhagic fever using recombinant antigens. XV International Congress of Virology, Sapporo, Japan (2011.09)
- 35) Sakai K, Nishio Y, Nagata N, Ami Y, Komase K, Shimojima M, Maeda K, Takeda M, Saijo M, Morikawa S. Characterization of canine distemper virus isolated from cynomolgus monkeys during 2008 epizootic in japan. XV International Congress of Virology, Sapporo, Japan (2011.09)

- 36) Sayama Y, Fukushi S, Saito M, Taniguchi S, Iizuka I, Mizutani T, Kurane I, Saijo M, Oshitani H, Morikawa S. A serological survey of Reston ebolavirus infection in swine during epizootic in 2008 in the Philippines. XV International Congress of Virology, Sapporo, Japan (2011.09)
- 37) Arai S, Gu SH, Baek LJ, Tabara K, Oh HS, Takada N, Kang HJ, Tanaka-Taya K, Morikawa S, Okabe N, Yanagihara R, Song JW. Expanded evolutionary insights from Jeju virus, a newfound hantavirus harbored by the Asian lesser white-toothed shrew (*Crocidura shantungensis*). XV International Congress of Virology, Sapporo, Japan (2011.09)
- 38) Mizutani T, Abe M, Ito N, Sakai K, Kaku Y, Oba Mami, Ogata M, Kurane I, Saijo M, Morikawa S, Sugiyama M. An isolated virus homologous to porcine sapelovirus from wild boar. XV International Congress of Virology, Sapporo, Japan (2011.09)
- 39) Taniguchi S, Watanabe S, Iha K, Fukushi Sh, Mizutani T, Saijo Ma Kurane I, Kyuwa S, Akashi H, Yoshikawa Y, Morikawa S. The detection of Reston ebolavirus antibodies in wild bats in the Philippines. XV International Congress of Virology, Sapporo, Japan (2011.09)
- 40) Yokote H., Hanada T., Satou A., Maruno S.. Update of an attenuated smallpox vaccine LC16m8 research. 2011 ASM Biodefense and Emerging Diseases Research Meeting. Baltimore, USA, (2011.02)

G.知的財産権の出願・登録状況

該当なし

1. 特許取得
 該当なし
2. 実用新案登録
 該当なし
3. その他
 該当なし