

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

研究要旨：

H23年度の本研究班では、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、その安全性を有効性の検証する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、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) 自衛隊中央病院
藤井達也
- (4) 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) LC16m8 株の痘瘡ワクチン曝露後接種時における副作用に関する研究
霊長類（カニクイザル）にサル痘ウイルスを鼻腔内接種法で感染させ、直後および1日後に細胞培養弱毒生痘そうワクチン（LC16m8）を接種し、その部位を経時的に観察するとともに、同部位からスワブを採取して Vero 細胞（サル痘ウイルスのみ増殖化能で、LC16m8 は増殖しない）および RK-13 細胞（LC16m8 を用いてウイルス分離を実施した。
- 2) 長期保管に伴う検討、品質試験法改善に伴う検討及び生物基準・検定基準見直しに関する検討
乾燥細胞培養痘そうワクチンの長期保管における安定性評価、細胞培養痘そうワクチン原液の長期保管における安定性評価、ワクチン添加剤の長期保管における安定性評価、凍結乾燥工程における凍結乾燥機の棚間による製剤の品質に及ぼす影響、現行生物基準及び検定基準の製造工程からの照査と課題整理、等の課題に関する検討がなされた。
- 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。

高度弱毒痘瘡ワクチン LC16m8 株曝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。6 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。さらにこれらの個体 18 頭における死亡例について, 生存例と比較して, 血液からのウイルス分離成績を評価した。

- 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おける統計学的研究

Vaccinia WR の抗原を用いたワクチニアプロテオミックチップを利用し, LC16m8 ワクチンによる初回接種者及び過去 1 回接種者の再接種において惹起される抗ポックスウイルス抗体の抗原評価を網羅的に行った。これにより, LC16m8 ワクチン接種によりヒトに誘導される抗体のプロファイルが明らかにした。

- 6) 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のデータから, 安全性と有効性の解析を実施した。

- 7) 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。

- 8) 弱毒生ウイルスワクチン (痘そうワクチン) の力価試験, 特性解析, 遺伝子機能解析に関する研究

LC16m8 株は, Lister 株から低温馴化により

LC16 株, LC16mO 株を經由して樹立された株である。LC16mO 株, LC16m8 株のほぼ遺伝子配列を比較すると, 両者の遺伝子配列の相違点は, B5R 遺伝子の一塩基欠失変異以外には 5 塩基のみである。その一方で, LC16 系統の親株である Lister 株は塩基配列にバリエーションのある多様なウイルス変異体の集合として存在している。つまり, Lister と LC16 系統はそれぞれ遺伝子に変異が生じやすいのか, それとも安定なのか今まで不明であった。そこで Lister 株と LC16mO からプラークローニングによって得られたクローンについてそれぞれ複数回継代を行ない, 継代前後で塩基配列を比較し遺伝子の安定性を検討した。

- 9) 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 について, 非特定の国民への緊急及び予防的使用を想定し, 安全性並びに有効性の検証を実施中である。これまでの研究で, 単回接種した LC16m8 による免疫効果が調査した接種後 1.5 年まで持続することを明らかにした。また, ワクチン接種により誘導された抗体による認識抗原タンパク群の軽時的な変化を Proteome Microarray Chip を用いたプロテオミック解析により調査し, 接種後 1 年目においても防御や中和に重要な抗原認識が持続していることを明らかにした。一方で, 1 年目以降は病原ウイルスに対する防御効果と中和抗体価に低下傾向が認められた。本年度はこの原因を調査した。

【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) LC16m8 株の痘瘡ワクチン曝露後接種時における副作用に関する研究

ワクチン接種部位の病変はサル痘ウイルスに感染していない個体にみられる病変に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。サル痘に特徴的な病変が出現する前の第 7 日目のサンプルからサル痘ウイルスが検出しはじめていた。このことは, 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に, 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を示唆する。

- 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検討

乾燥細胞培養痘そうワクチンについて、ワクチンの長期保管における安定性評価を行った。72 箇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の確認を行った。原液の長期保管における安定性評価を行い、36 箇月目まで安定であることが確認された。添加剤についても、9 年間冷蔵保管した検体で毒性等の変化は認められず、安定であることが確認された。

- 3) LC16m8 の臨床評価に関する研究

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

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おける統計学的研究

中和・防御に関係する抗原群 (D8L, A27L, A17L, H3L, A33R) について高い割合で陽転しており、LC16m8 ワクチンの天然痘に対する防御効果を支持する結果が得られた。D8L, H3L の抗体価が中和抗体価と特に高い相関を示しており、中でも D8L が中和抗体の重要な抗原である可能性が示唆されたほか、これま

で明らかにされていない抗原が中和と関係している可能性が示された。

- 6) 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

ワクチニアウイルスに対する獲得免疫の調査では、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。他ワクチンとの同時 (短期間) 接種が、副反応や有害事象を相乗・相加的に助長されるという事象も確認されなかった。

- 7) 劇症型サル痘発症機序の解明に関する研究

劇症型サル痘を発症した個体は高ウイルス血症、好中球減少症、非典型的発疹 (紅斑)、炎症性ケモカインおよびサイトカインの高値を示した。組織学的にはウイルス増殖病変部位の炎症性反応は乏しく、広範囲の臓器にウイルス抗原陽性細胞が存在した。さらに、マクロファージ、皮膚のサイトケラチン陽性の上皮細胞がウイルス感染・増殖細胞であることが判明した。また一方で、リンパ系組織においてリンパ球の減少、骨髄では顆粒球系細胞の減少がみられ、免疫不全状態であったことが示唆された。

- 8) 弱毒生ウイルスワクチン (痘そうワクチン) の力価試験、特性解析、遺伝子機能解析に関する研究

Lister 株と LC16mO どちらの株についても 1 継代目と 7 継代目を比較して変異は全く生じなかったことから、少なくとも Lister 株から選択されたクローンと LC16mO 株の遺伝的安定性は高いことがわかった。

- 9) 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

LC16m8 及び Lister 接種群が 1.5 年目も共通で認識を持続した抗原は 1 年目時点とほぼ同様であるが、その反応強度が概ね 10 分の 1 以下に低下していることを明らかにした。更に、病原ウイルス攻撃に応答して、その反応強度が著しく上昇したことから、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。

D. 考察

- 1) LC16m8 株の有効性及び副作用に関する研究。

サル痘ウイルスを鼻腔内接種経路で感染

させてその後に LC16m8 を接種した部位に重症の潰瘍性病変が出現した個体が認められた。このような病変が出現する場合には、原因として LC16m8 の B5R 遺伝子に一塩基欠損部位の近辺に 1 塩基挿入が生じ、Vero 細胞でも増殖生を回復したミドルプラーク形成株の出現によるもの、または、サル痘ウイルスによる病変によるものが考えられる。しかし、この個体では同病変から LC16m8 のみしか分離されず、それによる副作用であることが証明された（データ未表示）。サル痘ウイルス感染個体に対して、曝露後 LC16m8 接種時の接種部位の潰瘍性病変について詳細に観察するとともに、同部位の擦過物からのウイルス分離検査を実施した。上記の個体を除いて、重症潰瘍性病変がワクチン接種部位に出現した個体はなかった。曝露後接種の場合においても LC16m8 を安全に接種することが可能であることを示唆している。

カニクイザルのサル痘ウイルス鼻腔内接種感染モデルにおける、LC16m8 の曝露後接種のサル痘発症予防効果（軽症化）の効果は確認されない。死亡例と生存例において、ウイルス分離成績、特に末梢血液から採取された buffy coat 分画からのウイルス分離成績を解析したところ、死亡例では全例ウイルス感染後 14 日の献体がウイルス分離陽性を呈した。一方、生存例の多くのウイルス接種後 11 日目の血液検体がウイルス分離陰性を呈した。LC16m8 の霊長類における曝露後サル痘発症予防効果、ひいてはヒトにおける天然痘に対する曝露後発症予防効果を誘導するには、ウイルス感染後 14 日には血液からのウイルス分離が陰性になる程度に、免疫を誘導しなければならないことを示している。

劇症型サル痘個体の皮膚所見は、天然痘患者の臨床症状分類のうち、「扁平型」に類似すると考えらる。劇症型サル痘発症の要因は、免疫不全状態、特に骨髓低形成による好中球低下症が関連していると推察された。カニクイザルの SRV 感染症は免疫能低下の一因となるが、個体によって症状の程度が異なる。また、SRV に対する血中中和抗体価陽性、血中 SRV ゲノム陰性の個体の免疫状態は、通常、ほぼ正常に復帰している。しかしながら、ポックスウイルス感染そのものでも強い免疫抑制状態に陥るため、劇症型発症に対する SRV 感染歴の相乗効果は否定できない。劇症型サル痘発症個体では典型的な発痘形成はみられず、組織学的には好中球の浸潤はみられなかった。非典型的発疹形成の機序は好中

球減少症との関連性が疑われるが、今後の検討が必要である。好中球低下症は劇症型サル痘発症個体における敗血症の一因であると考えられた。蛍光二重染色法と電子顕微鏡学的解析によって、サイトケラチン陽性の上皮細胞と Mac387 陽性のマクロファージがサル痘ウイルスの感染・増殖細胞であることを示した。

国内外の痘そうワクチン及びワクチニアウイルスの研究動向を調査評価し、痘そうワクチン LC16m8 が天然痘テロ対抗医薬品に求められると想定される要件を満足しているかについて動物モデルを用いて評価中である。有効性評価については、これまでの研究で、単回接種したワクチンによる免疫効果が接種後 1.5 年まで持続することを明らかにした。また、ワクチン接種により誘導された抗体による認識抗原タンパク群の軽時的な変化を調査し、接種後 1 年目においては防御や中和に重要な抗原認識が持続することを明らかにした。一方で、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た。ワクチン接種後 1.5 年目では、LC16m8 及び Lister 接種群が共通で反応陽性率 100% を示した抗原は 9 種類であり、1 年目時点で認識が持続していた抗原のうち 7 種類を含んでいた。一方で、これらの抗原の反応強度は 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、このことが致死的な病原ウイルス攻撃に対する軽微な症状出現といった発症防御効果の低下や中和抗体価の低下に起因していると考察した。1 年目以降では防御効果と中和抗体価に低下傾向が認められるものの、依然として症状の重症化を阻止可能な免疫効果が持続（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。

LC16mO 株だけでなく Lister 株についても、少なくともそのクローンは遺伝子レベルで安定であることが示唆された。Lister 株は塩基配列にバリエーションが存在した、ウイルス変異体の集合として存在しているのかは不明である。生ウイルスをワクチンとして使用する上で、その遺伝子が安定であることはその効果、安全性を維持する上で極めて重要である。本結果はワクチニアウイルスのワクチンとしての質を維持する上での重要な知見となる。

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.

B 群 (LC16m8 の親株である Lister 株を接種された世代) では, WR148, A36R が, C 群では WR148, D13L, I1L, H3L, A13L が, D 群では WR148, I1L, D13L, H3L, A13L, D8L, A9L が主要な抗原であった. C 及び D 群については池田株及び大連 1 株を接種された世代である. LC16m8 接種後の血清 (初免疫の A 群) において, WR148, D13L, D8L, A13L, A10L, A27L, I1L の 7 抗原が陽転した. WR148 が封入体関連のタンパク質, A10L, I1L はコアタンパク質であり, 他は IMV の膜タンパク質であるが, 他のウイルス株を用いた研究の結果ともおおむね一致している. LC16m8 接種により誘導される抗体のプロファイルを, Dryvax 株接種後並びに天然痘回復期血清のプロファイル (Proteomics, 2007) と比較したところ, 陽性率の差はあるものの, B5R 以外は LC16m8 株の接種により同様の抗原について抗体誘導が認められた. 加えて, Dryvax 株による初免疫, 再免疫の血清との比較では, 抗原ごとの接種回数による誘導パターン, すなわち, I1L, L4R に対しては再免疫により陽性率が上昇し, A17L に対しては接種回数が少ない群の方が, むしろ陽性率が高いという点が類似していた. B5R については, LC16m8 株では切断型のタンパク質のみが発現していると考えられるにもかかわらず, A 群でも一定のシグナルが認められた. 他の抗原との交差性については今後の解析が必要である.

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常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) についても, 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.

化血研製造ロットの長期保存安定性試験により, 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, 安定であることが示された. 千葉血清製造ロットを用いた安定性試験においても, 十分に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 36 箇月目まで有効成分等に変化は無く安定であることが確認された. また, 添加剤については, 10°C 以下の冷蔵保存でも少なくとも, 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.

品質試験の見直し検討では, 現行安定性試験は, 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判断され, 基準からの削除の可能性を検討することになった. 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. 生物基準の改正, 検定基準の変更については, 既に感染研検定協議会の承認が得られ, 現在, 審査管理課による生物基準改正の告示待ちの段階になっている.

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) Johnson BF, Kanatani Y, Fujii T, Saito T, Yokote H, Smith GL. Serological responses in humans to the smallpox vaccine LC16m8. *J Gen Virol* 92:2405-2410, 2011
- 2) 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. *J Infect Dis* 204:1395-1402, 2011
- 3) 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 is dependent on T cells and not B cells. *J Infect Dis* 203:1043-1053, 2011
- 4) 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. *J Virol Methods* 180:68-74, 2012
- 5) 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)
- 6) Tani H, Morikawa S, Matsuura Y. Development and applications of VSV vectors based on cell tropism. *Frontiers in Microbiol* 2: 1-7, 2012
- 7) 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
- 8) 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. *Emerg Infect Dis* 17:1559-1560, 2011

- 9) 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) 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)
- 2) 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)
- 3) 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)
- 4) 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
- 5) 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)
- 6) 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)
- 7) 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)

- 8) 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)
- 9) 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)
- 10) 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)
- 11) 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)
- 12) 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)
- 13) Taniguchi S, Watanabe S, Iha K, Fukushi S, Mizutani T, Saijo M, 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)
- 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

感染動物モデル及び胎盤組織培養系を用いた先天性サイトメガロウイルス感染機構の解析と中和抗体及びワクチンの開発

所属 国立感染症研究所ウイルス第1部
研究代表者 井上 直樹

研究要旨 先天性サイトメガロウイルス (CMV) 感染は新生児 300 人当たり 1 人に起こり、その 2 割以上に難聴・精神発達障害等の後遺症が生じる。ワクチンは未開発であり、抗ウイルス薬も毒性が強く妊婦に使用できない。本研究では、胎盤培養系及び感染動物モデルなどを用いて、経胎盤感染機構を明らかにするとともに、CMV に対するサブユニットワクチンやヒト型モノクローナル抗体等の開発を行う。本年度計画は順調に実施され、以下の結果を得た。1) 昨年度構築したヒト胎盤片組織をマウス腎に移植した SCID-hu マウスモデルに強毒 CMV 株を感染すると、ヒト胎盤の栄養膜細胞の腎実質組織への侵入と血管新生を阻害するが、弱毒株では非感染と変わらないこと、強毒株による阻害にはウイルス感染に伴い産生されるパラクラインな細胞性蛋白が関与することが明らかとなった。こうした機序による胎盤機能障害が先天性 CMV 感染による子宮内発達遅滞の原因になっていると推測される。2) 妊娠マウスの胎盤に直接マウス CMV を接種して、個体レベルで胎盤内のウイルス増殖を解析できる系の確立に成功した。胎盤マクロファージと間質細胞に感染が見られ、ヒトの後期胎盤での感染像と類似していた。3) 妊娠モルモット感染モデルを用いて、感染に伴い変動する遺伝子群を同定したところ、感染時の妊娠週齢に関わらず、主に細胞の代謝・分化・細胞周期に関するものであった。4) モルモット胎盤片を組織培養し、蛍光蛋白発現モルモット CMV を感染させることにより感染を視覚化できる系を確立した。5) 糖蛋白 B 発現組換えアデノウイルスにより妊娠初期にモルモットを免疫すると、CMV 感染に伴う母体・胎仔両者の体重減少を抑制可能であるとともに、先天性感染もほぼ阻害された。

研究分担者

片野 晴隆 (国立感染症研究所感染病理部)
小杉 伊三夫 (浜松医科大学・病理 II)
竹腰 正隆 (東海大学医学部)

外国側研究者(研究委託)

Lenore Pereira (カリフォルニア大学
サンフランシスコ校)

A. 研究目的

サイトメガロウイルス(CMV)は小児期に無症候感染し生涯続く潜伏感染を樹立するが、健常人に疾病を起さない。しかし、妊婦の CMV 感染は胎盤を経て胎児に感染を起こし、胎盤・胎児の形態形成や機能阻害から流産・死産、更に出生児の発達障害等を引き起す。我々は、先天性 CMV 感染が新生児 300 人当たり 1 人に見られ、感染児の 2 割以上に遅発性後遺症が発生するなどダウン症と並び先天性中枢神経系障害の最大の原因であることを明らかにしてきた(Ogawa 他 2007;Koyano 他 2009, 2011)。少子化の現代におい

て、先天性 CMV 感染は重篤な神経学的後遺症をもたらすため、ワクチン導入以前には問題であった風疹による先天性感染症に相当する対策が必要と考えられる。

先天性感染は、異なる遺伝子型株の再感染や再活性化によっても起こるが、十分な中和抗体により相当程度感染を制御できることから初感染が主な原因であることが疫学的に知られる。CMV がコードする糖蛋白 B(gB) が、中和抗体の主要な標的のひとつであることが長く知られている。膜貫通ドメインを取り除いた gB 蛋白をアジュバントとともに投与するサブユニットワクチン候補を用いた臨床試験が最近行われ、50%程度の効果があったが、実用化には、まだほど遠い状況にある。感染妊婦にヒトグロブリン製剤を投与する治験から、抗体治療が一定の効果がある可能性も報告されている。しかしながら、すべての初感染妊婦に適用可能な治療法とはいえない。既存の抗 CMV 薬も毒性が強く妊婦や新生児への使用には制約がある。

そもそも胎盤は妊娠期にのみ形成される特殊な臓器であり、妊娠の維持や胎児発達に重要な役割を担っているが、経胎盤感染や胎盤での感染防御機構など不明な点が多い。従って、経胎盤感染機序を解明するとともに、基盤的研究成果をもとにワクチンや抗体を用いた感染防御・治療法を開発することが求められている。

本研究は、感染防御・治療法の前臨床試験にとって必須である感染動物モデルとその組織培養系を確立し、抗体治療の科学的根拠やサブユニットワクチンの動物モデルでの評価法を確立することにより、ヒトでの臨床試験への方向性を示すとともに、学術的には、ヒト及び小動物での感染機序の解析から、神経学的後遺症の発生機序の解明や胎盤・胎児の分化・発達に関する科学に貢献することをめざすものである。本研究は、大きくヒト胎盤材料を用いた解析（小杉, Pereira）、ヒト胎盤片を移植した SCID マウスでの感染の解析（Pereira）、マウス胎盤内感染モデル(小杉)やモルモット先天性感染モデル(井上, 片野)を用いた感染機構の解析とワクチン開発、ヒト CMV に対する中和抗体の開発(竹腰)から成る。研究のアウトライン・役割分担を図 1 に示した。

B. 研究方法（本研究に特徴的な方法のみを記載）

1. ヒト CMV 感染胎盤組織の解析(小杉)

感染が確認された 6 例の胎盤組織パラフィンブロック及び双胎分娩時に双胎羊膜構造を確認する目的で病理検査用に提出された非感染の妊娠後期胎盤を正常対照として解析した。血管内皮細胞を抗 CD31 抗体、マクロファージを抗 CD68 抗体、血管周囲細胞を抗 CD146 抗体、抗 PDGFR- β 抗体、抗平滑筋アクチン抗体を用いて検出した。

2. SCID-hu を用いた解析(Pereira)

妊娠 8-10 週の中絶胎盤 5 検体を細切し、C.B-17 scid/scid マウス 65 匹に移植した(図 3 左)。移植直後もしくは移植 3 週後に 1×10^6 PFU のヒト CMV を感染させた。感染 3 週間後に取り出し、病理解析及びウイルス力価測定を行った。

3. マウス胎盤内感染モデル(小杉)

麻酔下で妊娠 13.5 日の C57BL/6 マウス胎盤胎仔側の labyrinth zone に、マイクロインジェクションポンプとガラス毛細管針を用いて、 $1 \mu\text{l}$ (10^5 PFU) の緑色蛍光蛋白発現マウス CMV を接種した。

1,3,5 日後に胎盤・胎児を採取し、蛍光観察、病理解析及びウイルス力価測定を行った。

4. 妊娠モルモット感染モデル(井上・片野)

妊娠 1~5 週齢のモルモット(Hartley)にモルモット CMV を個体当たり 2.0×10^6 pfu 皮下接種し、接種一定期間後に炭酸ガスで安楽殺し、血液、諸臓器、胎盤・胎仔を採材した。胎盤は細切し、ウイルス DNA 定量、マイクロアレイ解析、病理解析に用いた。rAd-gB 免疫を行った場合には、免疫 3 週後にモルモット CMV 接種を行った。

5. マイクロアレイによる遺伝子発現解析(井上)

Ensembl の BioMart より annotation 情報と共に入手したモルモット cDNA 配列をもとにカスタム合成したスライドを用いた。感染及び非感染妊娠モルモットより、RNA を調製し、標識・精製後、アレイスライドと反応させた。DNA Microarray Scanner により蛍光の読み取り及びデータの数値化を行い、GeneSpringX11.0.4 を用いて解析した。個々の遺伝子の機能には IPA を用いた。

(倫理面などに対する配慮)

- 1) 胎盤組織の利用にあたっては、関係機関の倫理委員会の承認を得た。なお、胎盤は出産後の不要組織であることから、匿名化した利用は、提供者に対する不利益をもたらさない。その提供に当たっては、研究の必要性と匿名性を明確にし、インフォームドコンセントを得た。
- 2) 妊娠モルモットを用いた経胎盤感染実験及び組換えアデノウイルス(rAd)を用いた免疫実験は、国立感染症研究所動物実験委員会より、妊娠マウスを用いた胎盤感染実験は、浜松医大よりそれぞれ実験認可を受け、承認内容を遵守し、動物愛護の精神に基づき実験を行った。
- 3) 蛍光蛋白を発現する組換えモルモット及びマウス CMV の作製・利用など遺伝子組換え生物等の第二種使用等に当たって執るべき拡散防止措置については、大臣確認申請に対し承認が得られている（井上直樹、平成 20 年 1 月 28 日付 19 国文科振第 39 号；小杉伊三夫、平成 18 年 4 月 4 日付 17 学文科振第 600 号）。非増殖型 rAd の作製、ヒト型モノクローナル抗体の産生に関わる DNA 組換え実験は、それぞれ機関承認されている。カルタヘナ条約を遵守し適正に各実験を実施した。

C. 研究結果

1. ヒト CMV 感染胎盤組織の病理解析(小杉)

昨年度の CMV 感染ヒト胎盤組織のパラフィンブロックの病理解析の結果、未熟な胎盤ほど、ウイルス抗原及び DNA が高頻度に見られ、ウイルス感受性と増殖が高度であることを観察した。ウイルス抗原は、絨毛間質に高頻度に認められたが、栄養膜上皮への感染は見られなかった。絨毛間質の血管内皮及びマクロファージが標的細胞である一方、それ以外の細胞にも抗原が認められていたため、本年度は、その細胞種の同定を行った。その結果、血管周囲細胞への感染が認められ、感染部では血管の破壊・消失が認められた。

2. ヒト胎盤片移植 SCID-hu 感染モデル (Pereira)

ヒト CMV 強毒株 VR1814 もしくは実験室で継代し弱毒となった AD169 株をヒト胎盤栄養膜細胞培養系で感染させると、VR1814 株が AD169 株に比してウイルス産生量が大きい。ヒトの胎盤においては、胎児側から栄養膜細胞が母体側の子宮に侵入し血管を再構築し、より胎児に栄養等が供給されるにする (図 2)。胎盤を腎臓被膜下に移植した SCID マウス(SCID-hu)モデルにおいては、胎盤片中の栄養膜細胞が子宮の代わりにマウス腎実質組織に侵入し、血管再構成が誘導される。ヒト CMV をこのモデルに感染させると、強毒である VR1814 株でのみ、細胞侵入と血管再構成が阻害された(図 3 右)。VR1814 感染胎盤片中では、VEGF-C と bFGF の発現が有意に増加した。これらの結果から、ウイルス増殖とパラクラインな蛋白により栄養膜細胞による血管の再構成が抑制され、そのために先天性 CMV 感染に伴う妊娠中の出血、低酸素症、水腫を引き起こすことが示唆された。

3. 妊娠マウス胎盤内直接感染モデル(小杉)

マウス胎盤は、ヒト胎盤に比較してバリア機能が強固で母体血中から胎児側への経胎盤感染が殆ど生じない。しかし、胎盤内に直接ウイルス接種を行ったところ、胎児の生存率は胎生 12 日までの接種では 50%以下であるが、13 日では 80~90%であった。そこで、胎生 13 日にウイルス接種した後、5 日間の胎内感染動態を解析した。ウイルス価は感染 3 日までに最高値に達し、胎盤では以後持続ないし漸減した。各臓器の感染性ウイルス価は胎盤 \geq 心>肝>脳の順であった。

胎盤の感染細胞は、主に胎児側の labyrinth zone と羊膜上皮・上皮下の間質に認められ、母体側の基底脱落膜では極僅かであった(図 4)。免疫染色では、主に血管周囲に感染が認められ、2~3 割はマクロファージであった。栄養膜細胞には感染を認めないことから、ヒト後期胎盤の感染像と類似した。従って、胎盤から胎児への感染機序を解析するために有効なモデルが確立されたと考えられる。

4. 妊娠モルモット感染動物モデル

1) 感染機序の解析(井上・片野)

感染時の妊娠週齢や感染後の期間を変えモルモット CMV 感染に伴う妊娠モルモットの病態を解析した結果、胎盤から胎児への感染には、1 週間以上の期間を要すること、胎盤への感染ウイルス量が少なくても胎児に体重減少が生じることなどを見出した。

病理組織学的解析では、parietal trophoblast giant cell に感染が起こり、その後、限局された領域でスポット状に spongiotrophoblast が感染することが明らかになり、cell-to-cell での感染伝播様式が示唆された。

モルモット胎盤片の組織培養系を確立することに本年度成功し、蛍光蛋白発現組換えモルモット CMV を感染させると、島状の増殖がみられた(図 4)。これは母体中の胎盤での感染様式に良く似たものであった。内皮など細胞マーカーに対する抗体を作製し、現在、この系での感染細胞種の特定を行っている。

2) 感染動物胎盤での遺伝子発現解析(井上)

マイクロアレイ解析により感染および非感染胎盤における宿主遺伝子発現を比較したところ、感染により変動する遺伝子は、感染妊娠週齢が異なっても、主に細胞代謝や分化、細胞周期に関するものであることがわかった。現在、個々の遺伝子発現と胎盤の分化や形態形成への機能的関連を検討している。

3) 妊娠モルモットを用いたワクチン開発(井上)

gB 発現組換えアデノウイルス(rAd-gB)により免疫を行ったモルモットでは、モルモット CMV 感染に伴う子宮内発達遅滞や体重減少が見られなかった(図 5)。rAd-gB 免疫により 85%以上の胎児において先天性感染が阻害されるが、その

効果は、胎盤での感染防御レベルで作用し、一旦胎仔に感染が至ると防御効果がないことが示唆された。

5. ヒト型抗 CMV 抗体の作製(竹腰)

昨年度、HCMV 糖蛋白 B (gB) を介して中和能を示すヒト Fab 抗体を作製し、今年度は、新たな抗原として UL130 を発現することに成功した。

D. 考察

Pereira らは、ヒト胎盤絨毛組織片や胎盤絨毛由来細胞の培養系を確立し、MMP9 など胎盤分化に重要な遺伝子の発現に CMV 感染が影響すること (Yamamoto-Tabata 他 2004)、中和抗体が感染防御に重要であること (Maidji 他 2007) をこれまでに示した。昨年度、世界に先駆けて、ヒト胎盤片を移植した SCID マウスにおいてヒト CMV の感染・増殖を検討できるモデルを確立し、細胞分化に関与する HLA-G の感染細胞での発現抑制やパラクライン(傍分泌)効果による感染細胞の周囲の非感染細胞への増殖誘導などを見出した。今年度、このモデル系において、胎盤形成の最も重要なプロセスである栄養膜細胞の子宮組織への侵入と子宮内血管の再構成が、CMV 感染により阻害されることが実証された。小杉が行ったヒトの感染胎盤の病理解析においても、造血幹細胞を保持し血管構造の維持と制御機能を担う血管周囲細胞に CMV が感染し、血管構造の消失が見られることから、SCID-hu モデルで見られた現象は、実際の胎盤で生じていることと一致している。

妊娠モルモット感染個体から得た胎盤のアレイ解析により、感染に伴い胎盤で発現が変動する遺伝子群を同定した。モルモット胎盤片の組織培養系において、こうした遺伝子群の発現変動が再現できるか、対応するヒトの遺伝子群の発現がヒト胎盤由来細胞で見られるかを現在検討する。今後、細胞培養系での機能解析やヒト胎盤病理での解析と併せ、RNAi を用いて各遺伝子機能抑制が個体レベルでどのように影響するかを解析する予定である。

ヒトでは CMV は胎盤の浸潤性栄養膜細胞に最初に感染し、細胞性栄養膜細胞を介して胎児に感染していく。モルモットにおいても、母体から胎児側への入り口に位置するこの浸潤性栄養膜細胞と機能的に同じ役割を果たすモルモット胎盤の parietal trophoblast giant cell にまず感染し、その

後、限局された領域でスポット状に spongiotrophoblast に感染する。マウス胎盤内感染でも感染はスポット状に広がる点は同様であるが、栄養膜細胞への感染が見られない点は、モルモットの場合と異なっている。この相違は、妊娠時期、感染が最初に起こった部位、動物種ごとに異なる胎盤構造など、いくつかの原因が考えられる。

ヒト胎盤材料を用いた研究は、多くの妊婦が妊娠前に CMV 陽性であること、胎盤採取が流産時等に限られるなどの制約がある。小動物で唯一ヒトと同様な経胎盤感染を起こすモルモット CMV の研究は、そうした制約を補完することを可能にすると思われる。一方、モルモット CMV による経胎盤感染が、どこまでヒト CMV による経胎盤感染と似ているかを明確にすることが重要である。

妊娠モルモットにおいて gB 免疫が胎盤への感染抑制を通して発達遅滞の抑制を可能にしていることから、CMV 感染に伴う胎盤機能の低下を抑制することが先天性感染の制御に必須であることは間違いない。一方で、胎盤から胎児へ感染が及ぶと、感染拡大が抑制されていないと思われる。今後のワクチン開発を考える時、胎盤での完全な防御には、gB 免疫により誘導される中和抗体量を高くする必要があるのか、gB 以外の異なる抗原に対する中和抗体が、胎児への感染に対して有効であるのかなどを検討していく必要がある。

近年、ヒト血清は線維芽細胞よりも上皮・内皮細胞への CMV 感染防御 (中和) を誘導することが分かり、UL128-131 糖蛋白が gB 以上の中和抗体誘導能を持つことも判明した。本研究では胎盤感染機構を解析するためにいくつかのモデル系を確立したが、これらの系を用いて基礎的な研究をすることに加えて、UL130 など新たな抗原に対するサブユニットワクチンやヒト型モノクローナル抗体を評価する作業を、さらに推進することが重要であり、現在、井上が UL130 に相当するモルモット蛋白のサブユニットワクチンを、竹腰がヒト型モノクローナル抗体の開発を進めている。

E. 結論

- 1) ヒト胎盤組織を移植した SCID マウス感染モデルにおいて、栄養膜細胞がもつ実質組織への侵入や血管再構成能力を CMV が阻害すること、

感染胎盤では VEGF-C と bFGF の発現が有意に増加することが明らかとなった。こうした機序により胎盤機能が低下し、子宮内発達遅滞を引き起こすことが示唆される。

- 2) 妊娠マウス胎盤内感染モデル及びモルモット胎盤片の組織培養系の確立に成功した。妊娠モルモット感染モデルをあわせ、こうした系で得られた感染像が、ヒトの感染像と共通性が高いこと示唆される。
- 3) 糖蛋白 B による免疫は、胎盤での感染制御による先天性感染防御に有効であるが、胎盤から胎児への感染防御には作用していないと思われる。
- 4) マイクロアレイを用いたモルモット感染動物モデルの胎盤での遺伝子変動解析から、胎盤の細胞分化や細胞周期に感染が影響を与えていると考えられる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yamada S, Taniguchi R, Kosugi I, Inoue N. (2012) Cytomegalovirus, *In*: (Eds) Singh SK & Ruzek D. "Neuroviral Infection" Taylor & Francis CRC Press, *In press*
- 2) Ikuta K, Ishioka K, Sato Y, Imamura T, Asano K, Koyano S, Inoue N, and Suzutani T. (2012) A novel real-time PCR method for the determination and quantification of each cytomegalovirus (CMV) gH-subtype in clinical samples. *J Clin Microbiol* 50:499-501.
- 3) Kashiwagi Y, Nakajima J, Ishida Y, Nishimata S, Kawashima H, Miyajima T, Takekuma K, Hoshika A, Inoue N. (2011) Prolonged valganciclovir therapy for congenital cytomegalovirus infection. *J. Infect. Chemo.* 17: 538- 540.
- 4) Ishibashi K, Tokumoto T, Shirakawa H, Hashimoto K, Ikuta K, Kushida N, Yanagida T, Shishido K, Aikawa K, Toma H, Inoue N, Yamaguchi O, Tanabe K, Suzutani T. (2011) The lack of antibodies against the AD2 epitope of cytomegalovirus (CMV) glycoprotein B (gB) is associated with CMV disease after renal transplantation in recipients having gH serotypes same as their donors. *Transplant Infect Dis* 13:318-323
- 5) Tabata T, Pettit M, Fang-Hoover J, Rivera J, Nozawa N, Shiboski S, Inoue N, Pereira L. Cytomegalovirus impairs CTB-induced lymph-angiogenesis and vascular remodeling in an in vivo human placentation model. (submitted.)
- 6) Pereira L. (2011) Have we overlooked congenital cytomegalovirus infection as a cause of stillbirth? *J Infect Dis.* 203:1510-2.
- 7) Ogawa-Goto K, Ueno T, Oshima K, Yamamoto H, Sasaki J, Fujita K, Sata T, Taniguchi S, Kanda Y, Katano H. (2012) Detection of active human cytomegalovirus by the promyelocytic leukemia body assay in cultures of PBMCs from patients undergoing hematopoietic stem cell transplantation. *J Med Virol* 84:479-86.
- 8) Kawasaki H, Kosugi I, Arai Y, Iwashita T, Tsutsui Y. (2011) Mouse embryonic stem cells inhibit murine cytomegalovirus infection through a multi-step process. *PLoS One* 6:e17492.
- 9) 小杉伊三夫 (2011) サイトメガロウイルス感染症と胎盤病理. *産科と婦人科* 2011, 78:303-9

2. 学会発表

- 1) 片野晴隆: KSHV 関連疾患の病理とウイルスがコードする miRNA. 第 100 回日本病理学会総会、2011 年 4 月、横浜
- 2) 小杉伊三夫, 河崎秀陽, 新井義文, 岩下寿秀, 筒井祥博: 発育脳神経細胞におけるサイトメガロウイルス感染と脳発達障害: 感染神経細胞における樹状突起の解析: 第 100 回日本病理学会総会, 2011 年 4 月、横浜
- 3) 河崎秀陽, 小杉伊三夫, 新井義文, 岩下寿秀, 筒井祥博: 幹細胞に着目したサイトメガロウイルス感染感受性の解析. 第 100 回日本病理学会、2011 年 4 月、横浜
- 4) 福地早希, 山田壮一、片野晴隆、佐藤由子、橋本楓、山口十四文、藤室雅弘、井上直樹: モルモット妊娠週齢とモルモット CMV (GPCMV) の先天性感染病態の関係. 第 26 回ヘルペスウイルス研究会、2011 年 6 月、大阪
- 5) 山田壮一、福地早希、橋本楓、福井良子、井上直樹: マイクロアレイを用いたモルモットサイトメガロウイルス感染胎盤における宿主遺伝子動態解析: 第 26 回ヘルペスウイルス研究会、2011 年 6 月、大阪
- 6) 橋本楓、山田壮一、加藤みなみ、福地早希、山口十四文、藤室雅弘、井上直樹: モルモット CMV(GPCMV)膜糖蛋白 B を用いた新規ヒト CMV ワクチン開発評価系の陽性コントロールの確立. 第 26 回ヘルペスウイルス研究会、2011 年 6 月、大阪
- 7) 生田和史、石岡賢、佐藤友香、石橋啓、浅野仁覚、今村孝、藤原成悦、久保隆彦、中井英剛、吉川哲史、森内浩幸、古谷野伸、井上直樹、錫谷達夫: リアルタイム PCR 法によるサイトメガ

ロウイルスの型別定量判別. 第26回ヘルペスウイルス研究会、2011年6月、大阪

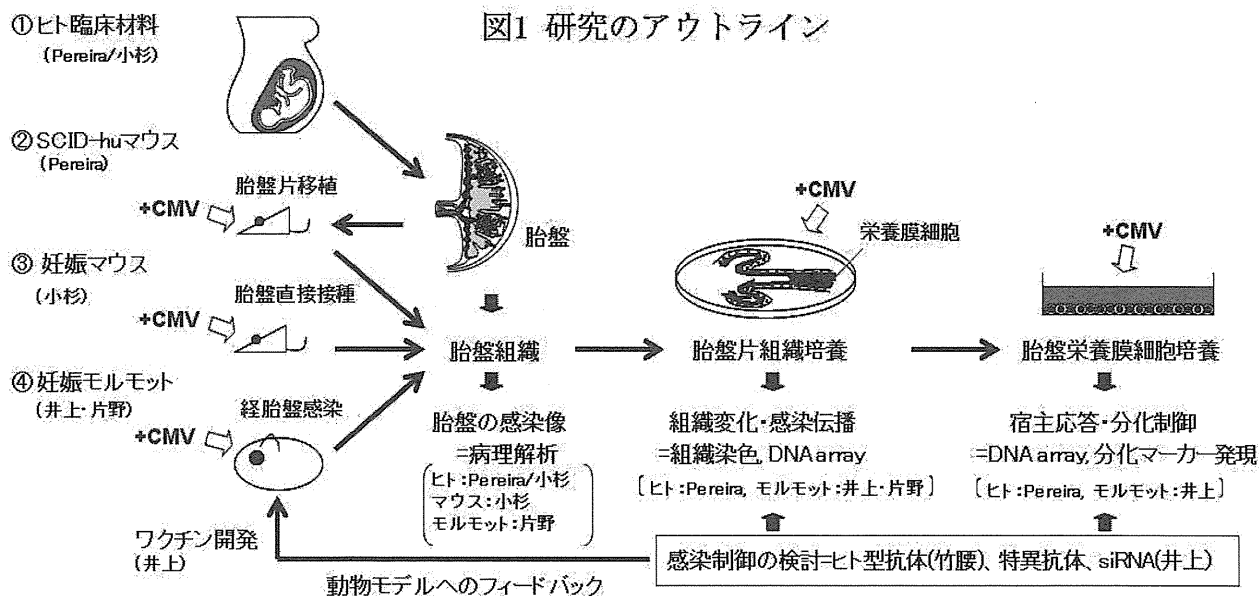
- 8) 佐々木純、上野智規、片野晴隆、佐多徹太郎、後藤希代子：PML法を用いた上皮細胞間におけるHCMV臨床分離株の感染経路の検討. 第26回ヘルペスウイルス研究会、2011年6月、大阪
- 9) 小杉伊三夫、河崎秀陽、新井義文、鈴木万幾子、大月寛朗、筒井祥博：ヒトサイトメガロウイルス感染胎盤の病理組織学的解析：第26回ヘルペスウイルス研究会、2011年6月、大阪
- 10) 片野晴隆、坂本康太、関塚剛史、黒田 誠：KSHVがコードしている16 baseのunusual small RNAの発現. 第8回EBウイルス研究会、2011年7月、大阪
- 11) Kiao H, Lee JH, Inoue N, Miyado K, Fujiwara S. Characterization of human cytomegalovirus UL136 gene product. The XVth International Congress of Virology. Sep. 2011, Sapporo.
- 12) Ikuta K, Ishioka K, Imamura T, Asano K, Yoshikawa T, Moriuchi H, Fujiwara S, Kubo T, Koyano S, Inoue N, Suzutani T. A genotypic and serologic study of cytomegalovirus (CMV) reinfection in mothers and neonates with congenital CMV infection in Japan. The XVth International Congress of Virology. Sep. 2011, Sapporo.
- 13) Sasaki J, Ueno T, Katano H, Sata T, Ogawa- Goto, K. Analysis for cell-to-cell spread of HCMV in

epithelial cells by using the PML assay. The XVth International Congress of Virology. Sep. 2011, Sapporo.

- 14) Kawasaki H, Kosugi I, Arai Y, Iwashita T, Tsutsui Y. Mouse embryonic stem cells inhibit murine cytomegalovirus infection through a multi-step process. The XVth International Congress of Virology. Sep. 2011, Sapporo.
- 15) 井上直樹：わが国における先天性サイトメガロウイルス（CMV）感染の現状と今後の対策の方向性、シンポジウム「わが国におけるウイルス母子感染の現況と今後の展望」、第81回日本感染症学会西日本地方会学術集会 2011年10月、北九州
- 16) 橋本楓、井上直樹：モルモット感染動物モデルを用いたサイトメガロウイルスワクチン開発の基礎検討、第15回日本ワクチン学会学術集会 2011年12月、東京

H. 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



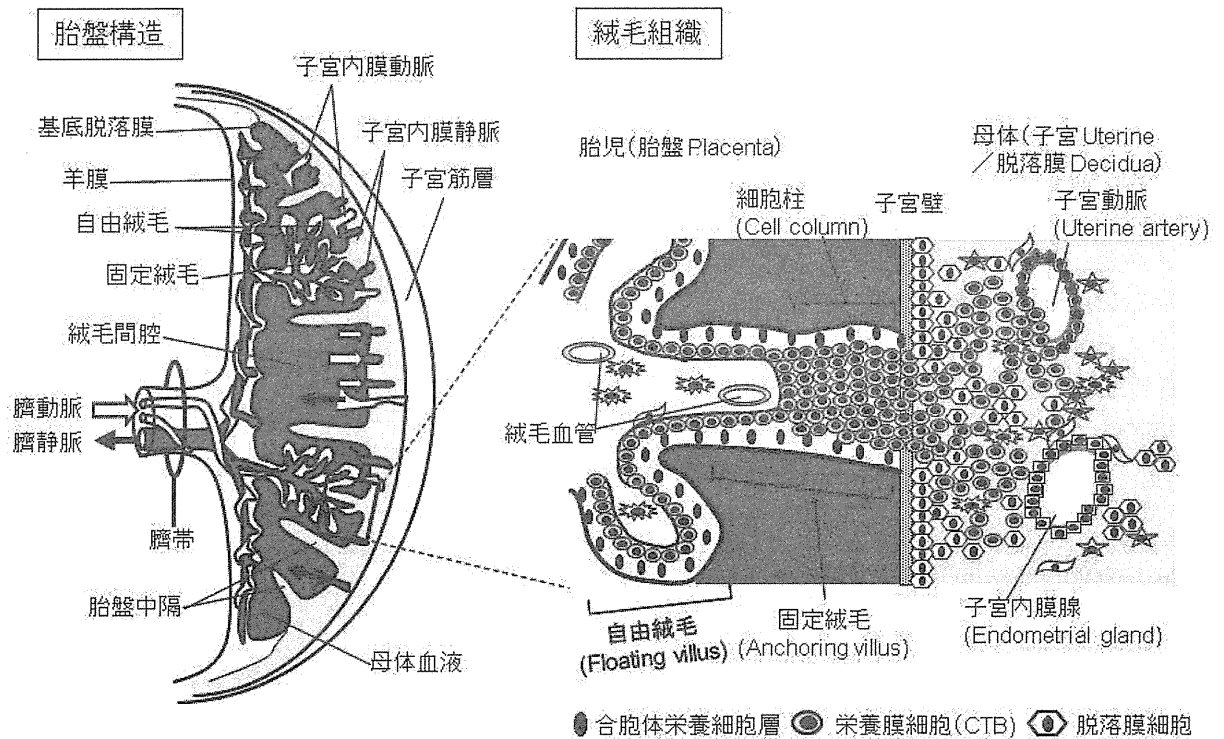


図2 ヒト胎盤の構造と栄養膜細胞(胎児)の脱落膜(母体)への侵入：胎盤絨毛中の栄養膜細胞は、子宮脱落膜に侵入し血管系の再構成を引き起こす。

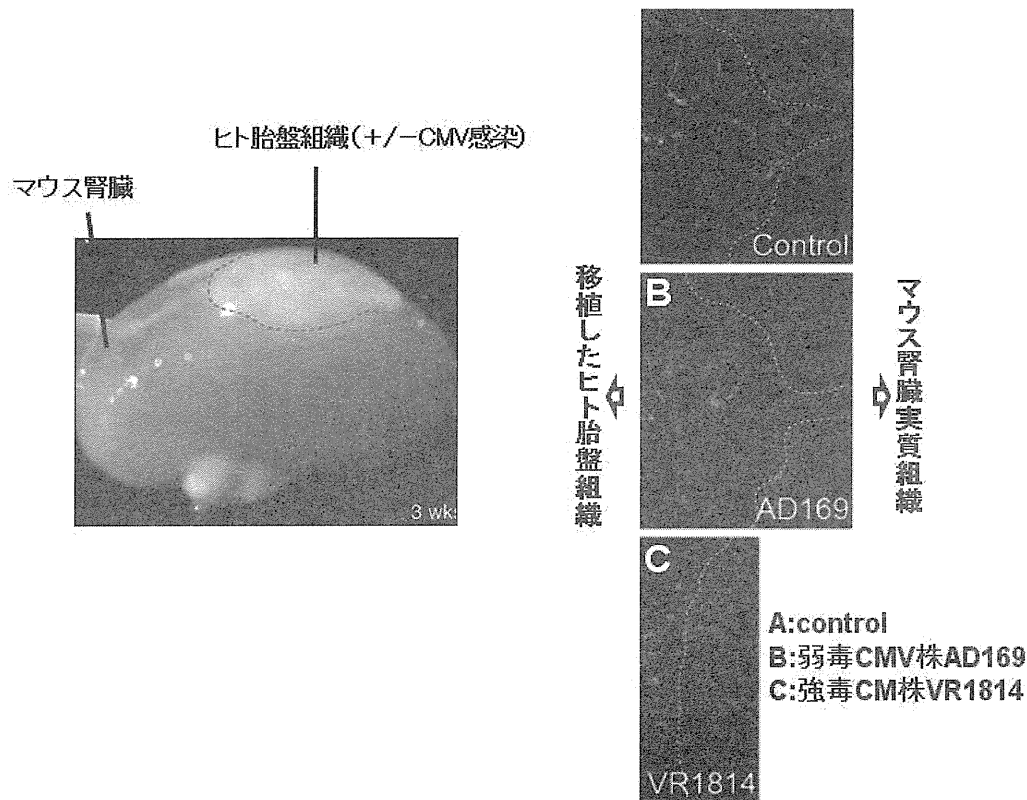


図3 SCID-hu モデルにおいて見られる栄養膜細胞の実質組織への侵入と強毒 CMV 株 VR1814 による阻害：(左)胎盤片を腎臓に移植した SCID-hu マウスの腎臓。(右) 抗体によるヒト栄養膜細胞の染色。破線がヒトとマウスの組織の境界に当る。A, B では、栄養膜細胞がマウス人実質組織に侵入している。

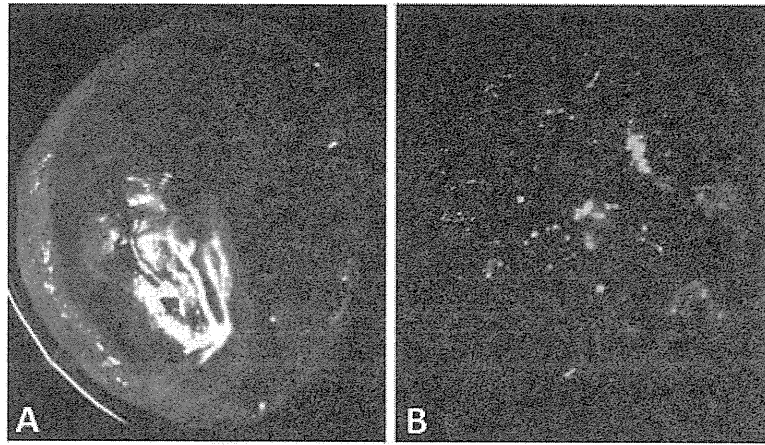


図 4 妊娠マウス胎盤内への緑色蛍光蛋白発現マウス CMV 接種によるウイルス増殖の視覚化：胎盤内に接種後 3 日。胎児側から観察した像。(左)明視野、(右)緑色蛍光

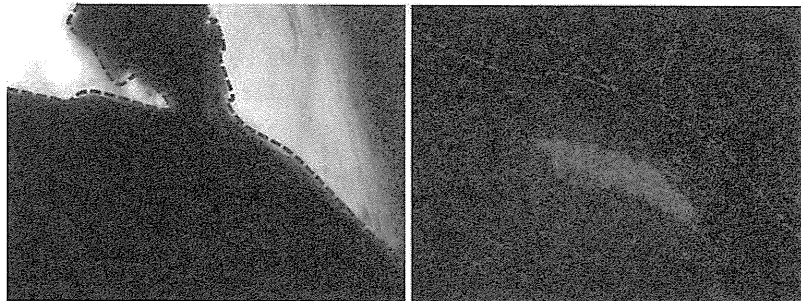


図 5.モルモット胎盤片組織培養系でのウイルス増殖の視覚化：赤色蛍光蛋白発現モルモット CMV 感染による感染後 4 日。(左)明視野、(右)緑色蛍光

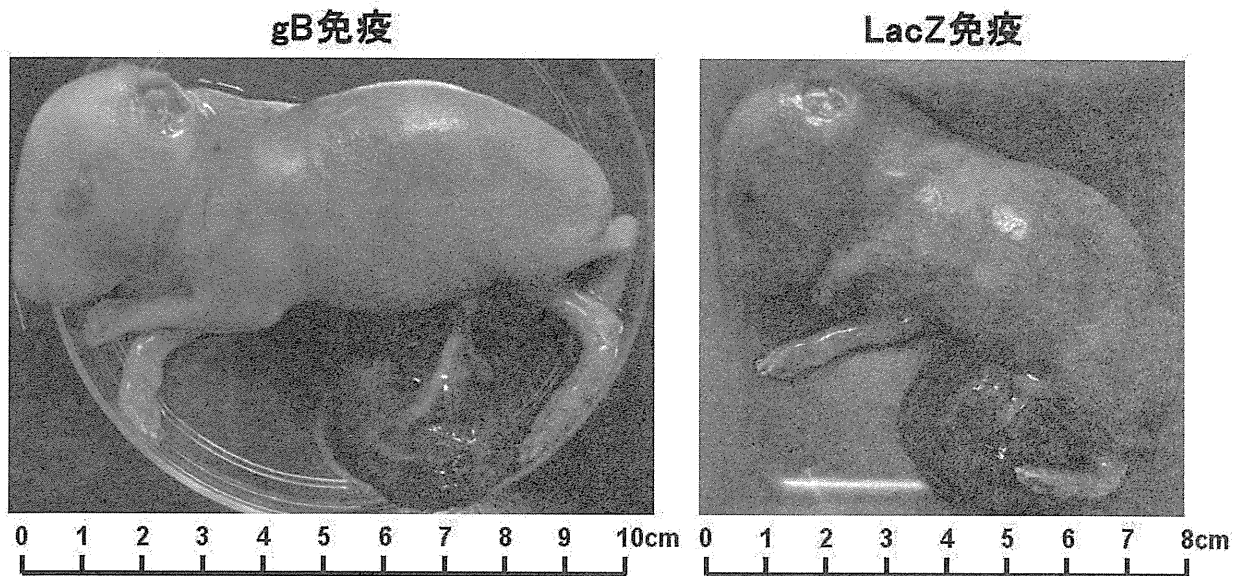


図 6. 妊娠モルモットのモルモット CMV 糖蛋白 B 免疫による先天性 CMV 感染に伴う胎仔の体重減少の抑制：妊娠 1 週時に gB もしくは LacZ 発現組換えアデノウイルスにより免疫 3 週後、モルモット CMV を感染し、3 週間後に観察。gB による免疫のない群 (LacZ) では、胎仔のサイズがおおよそ 2 割程度小さくなり、体重も減少している。

新しい結核治療ワクチンの開発研究（ヒトの結核感染に最も類似のカニクイザル・モデルを用いた）

所属 国立病院機構近畿中央胸部疾患センター臨床研究センター
研究者 岡田 全司
研究期間 平成21年4月～平成24年3月

研究要旨

1. 結核治療ワクチン（HVJ-E/HSP65+IL-12DNAにAg85A+Ag85B+MPB51 DNAを加えた）はサルで強力な結核治療効果を示した。
2. サルでこのワクチンにGra DNAを組み合わせた群は1年間の長期治療効果を発揮した。

研究分担者

- (1) 大阪大学大学院医学系研究科分子治療学 金田安史
- (2) ジェノメディア株式会社 中島俊洋
- (3) 金沢大学感染免疫 吉田栄人
- (4) 浜松医科大学感染症学 小出幸夫
- (5) 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科口腔微生物学分野 大原直也
- (6) 大阪大学医学系研究科感染免疫医学講座 竹田潔
- (7) 国立病院機構近畿中央胸部疾患センター 鈴木克洋
- (8) レオナルド・ウッド研究所 Esterlina Virtudes Tan
- (9) レオナルド・ウッド研究所 Paul Saunderson

A. 研究目的

我々は画期的な Hsp65+IL-12 DNA ワクチンを開発した。ヒトへの臨床応用にはヒトの結核感染に最も類似したモデルのカニクイザルを用いた研究が必須である。しかしながら、サルの実験では強毒結核菌、広大な ABSL3 動物実験室を必要とし、本邦で実施できる研究所は皆無。したがって、レオナルド・ウッド研究所と共同研究でサルを用い新しい結核治療・予防ワクチン開発を行った。

B. 研究方法

1. 新規結核治療ワクチンの開発。

①カニクイザルの感染系：

5×10²個の強毒ヒト型結核菌を気管内注入し、その後、ワクチン治療投与を行った。約1年間経過観察し、結核治療効果を

(1)血沈(2)胸部X線(3)体重(4)PPD 皮内反応(5)末梢血リンパ球増殖反応(6)免疫反応（リンパ球培養上清中の IFN- γ 、IL-2、IL-6 等サイト

カイン産生）を測定して評価した。

②マウスの感染系：

(1)DBA/1 マウスに結核菌 H37RV 株（ヒト型強毒株）1×10³/マウスとなるようにエアゾル・チャンバーを用いて経気道感染させた。感染後6回治療ワクチンを投与し、30～60日後に肺臓・肝臓・脾臓の結核菌数（CFU）を7H11 寒天培地を用い測定した。キラーT 活性、サイトカイン産生、T 細胞増殖反応でもワクチン効果を解析した。

(2)結核予防ワクチン効果は、BALB/c マウスを用いた。（岡田 Vaccine 2009, 2007, 2005）

2. 結核治療ワクチンの組み合わせ検討。臨床応用を目指す。

新しいワクチン・デリバリーの開発（製造技術・手法の最適化の検討）。アジュバント型 DDS を開発し、その免疫活性化機構を解明する。

カニクイザルの結核感染モデルを利用した薬効評価については、結核菌感染1ヶ月後より、DDS/Adj である HVJ-E に封入した治療用遺伝子（HSP-65、IL-12、Ag85B、Ag85A、MPT51、15K Granulysin）を単価ワクチン、或いは治療用遺伝子を適切に組み合わせた多価ワクチンとして2週間ごとに6回筋内に間歇投与を行った。評価試験は、カニクイザルの結核感染モデルを確立した研究施設であるレオナルドウッド研究所内（フィリピン・セブ島）にあるP3レベルのサル感染施設で実施した。試験に使用するカニクイザルは、治療用ワクチンを投与する前に予め結核菌の感染を実施し、被験物質の投与後に薬効と免疫活性化のパラメーターを測定することで評価を行った。

3. 評価試験に必要な DDS/Adj である HVJ-E については、これまでに確立した GMP 製造関連の手順書に従って GMP 製造施設内で製造を実施した。そのため、バイアル内での無菌凍結乾

燥による製剤化に必要なHVJ-E原薬をGMP製造した。

4. 安全性、毒性試験、GMPに準拠した製造。

(倫理面への配慮)

- (1) 当院は本邦の呼吸器疾患（結核を含む）の中心施設として、倫理委員会を設置し、倫理面には十分な配慮。新規ワクチン等、研究対象者に対する人権擁護上の配慮、研究方法による研究対象者に対する不利益、危険性の排除やインフォームドコンセントに関する文面も記載。
- (2) 実験動物に対し動物愛護上の配慮が十分なされている。3R(Replacement, Refinement, Reduction)の原則に基づき動物実験委員会で承認された動物実験を行う。
- (3) 株) ジェノメディアは、産業技術総合研究所の規定及び組換えDNA実験、動物取り扱いに関する指針に従い、各委員会で実験許可を受けてから実験を行う。

C. 研究結果

1. DNAワクチン(HVJ-エンベロップ (E) /Hsp65 DNA+IL-12DNA)の結核治療ワクチンの有効性評価:

- (1) カニクイザルを用いたHVJ-E/Hsp65 DNA+IL-12 DNAワクチンの結核治療効果。アジュバント効果を解明した。サイトカイン(IL-2等)を介したワクチンによる結核免疫増強作用を発見した。
 - ①興味深い下記、HVJ-E/HSP65 DNA + IL-12 DNAワクチンの治療メカニズムが解明された。すなわち、このワクチンで治療したサル末梢血リンパ球をHSP65抗原やPPD抗原で3日間刺激して、その培養上清中のIL-2を測定した。その結果IL-2の産生がコントロール群(生食)末梢血リンパ球刺激群より著明に増強された。またコントロール群の死亡サルではIL-2の産生が極めて低かった。すなわちIL-2産生とワクチン効果・生存は相関が認められた。
 - ②HVJ-E/HSP65 DNA + IL-12 DNAワクチン治療群では、5頭中5頭100%の生存を示した。コントロール群の生食投与群は60%(5頭中3頭)の生存率であった。すなわち、HVJ-E/HSP65 DNA + IL-12 DNAワクチンは著明な結核治療ワクチン効果を発揮した。(岡田 Vaccine 2009)
 - ③このHVJ-E/HSP65 DNA + IL-12 DNAワクチン治療により血沈の改善効果、体重増加効果、免疫反応の増強(①PPD、結核死菌H37Ra及びHSP65蛋白に対するワクチン治療カニクイザル末梢血リンパ球増殖反応増強効果、

ならびにIFN- γ 産生増強効果)が認められた。

- ④さらに、HVJ-E/HSP65 DNA + IL-12 DNAワクチンに結核免疫を強く誘導するAg85B DNA + Ag85A DNAを追加した、HVJ-E/HSP65 DNA + IL-12 DNA + Ag85B DNA + Ag85A DNAワクチンを作製した。このワクチンで治療したカニクイザルは5頭中5頭生存(100%生存)を示した。一方、コントロール群の生食投与群では4頭中2頭(50%)の生存率であった。HVJ-E/HSP65 DNA + IL-12 DNA + Ag85B DNA + Ag85A DNAワクチン治療群は、血沈の改善効果、体重増加効果、HSP65蛋白に対する末梢血リンパ球の増殖増強反応が認められた。
- (2) 今までのワクチンより強力な結核治療ワクチンを開発する為にサルの系で、このHVJ-E/Hsp65DNA+ IL-12DNAワクチン(Hsp65ワクチンと略す)にHVJ-E/Ag85A DNA+Ag85B DNA +MPT51DNAワクチン(Ag85Aワクチンと略す)(小出・吉田作製)+HVJ-E/Granulysin(Gra)DNAワクチン(Graワクチンと略す)を組み合わせて治療効果を解析中した。(各群4頭、合計16頭)結核治療効果を

(1)血沈(2)胸部X線(3)体重(4)PPD皮内反応(5)末梢血リンパ球増殖反応(6)免疫反応(リンパ球培養上清中のIFN- γ 、IL-2、IL-6等サイトカイン産生)を測定して評価した。臨床応用を考えpVAX:カナマイシン耐性ベクターを用いた。

G1 Graワクチン

G2 Hsp65ワクチン+ Ag85Aワクチン

G3 Hsp65ワクチン+Ag85Aワクチン+Graワクチン

G4 コントロール(生食投与群)

①結核菌気道感染28週後において、G2群のHsp65ワクチン+Ag85Aワクチン治療群では4頭中3頭生存(生存率75%)であり、Tリンパ球の増殖増強を示した。一方G4群のコントロール群では4頭中1頭生存(生存率25%)であった。すなわち、G2群のワクチンは極めて著明な結核治療効果を示した。(岡田、中島、金田、吉田、鈴木、坂谷、Tan、Saunderson)②結核菌チャレンジ1年後(365日)の生存率が25%であり良好な生存率を得た。コントロール群は0%の生存率であった。T細胞増殖反応もgranulysinワクチン投与群がコントロール群(生食投与)よりも有意(p<0.05)に増強した。G3群のHsp65ワクチン+Ag85Aワクチン+Graワクチン治療群では2頭生存し、Graワクチンは1年間にわたる長期生存率向上に大きく寄与することが示唆された。

- (3) 新しい結核ワクチンを用いた結核に対する治療ワクチン開発：リコンビナントSLPIでも結核治療ワクチン効果を明らかにした。さらに、HSP65ワクチン+Graワクチンの相乗的治療効果が得られた。(Human Vaccines 2010, 岡田 Human Vaccines 2011、喜多2011) (Vaccine 2009) また、GraワクチンとSLPIワクチンのIFN- γ 産生相乗効果が認められた(岡田、竹田)。
- (4) INHとHVJ-E/HSP65 DNA+IL-12 DNAワクチンとの相乗的治療効果：INHとHVJ-E/HSP65 DNA+IL-12 DNAワクチンはINH (Isoniazid) と相乗的治療効果を示した。BALB/cマウスの結核菌エアロゾル感染の系で、このワクチンとINH (Isoniazid) の併用治療群ではINH単独投与群やワクチン単独投与群と比較して肺臓の結核菌数の相乗的抑制効果を示した。
2. 世界に先駆けて、Gra蛋白ワクチン、及びGra DNAワクチンの結核治療効果を発見(岡田 Human Vaccines 2011)
3. ワクチン手法の最適化の検討：臨床応用を見据えた研究として、動物モデル(マウス)でのワクチン効果を指標に、投与方法・部位(筋肉、皮下、吸入、鼻腔内)、投与間隔・量・回数等検討した。HVJ-E/HSP65 DNA+IL-12 DNA治療ワクチンを感染後6回治療投与した。エアロゾル感染1ヶ月後の肺臓・脾臓・肝臓の結核菌数を測定した。その結果、皮下(i. d.)投与ワクチン治療群では皮下(s. c.)投与ワクチン治療群やi. m.投与ワクチン治療群より、脾臓内の結核菌数の有意な減少が認められた。すなわち皮下投与が最も強力な治療ワクチン効果を発揮することが示された。
4. Hsp65 DNA+IL-12 DNAワクチンが強力(BCGより1万倍強力)な結核予防ワクチン効果を得た、プライム-ブースター法の投与間隔・量を検討し、最適な条件を検討中であり、臨床応用を計画する予定。(マウス)
5. HVJ-Eの品質管理において、冷蔵条件で21ヶ月安定を実証した。(中島) GMPレベルのHVJ-E(中島供給)を用いて、臨床応用を想定しサルでの結核治療ワクチンを解析した。
6. MPT51ワクチン(小出、吉田、大原構築)、Ag85Aワクチン、Ag85Bワクチン(吉田)はHsp65ワクチンと組合せワクチン効果を得た。ワクチン効果解析のMPT51特異的ヒトT細胞株を樹立(小出Vaccine2010)。
7. HVJ-Eで刺激された樹状細胞からのType I IFNの産生がNK細胞からのIFN- γ の産生を促し、これがCTLを誘導することが示唆された。
8. HVJ-Eは樹状細胞よりIL-6の分泌誘導を

介し、制御性T細胞を抑制し、結核免疫を増強。RIG-Iレセプターを活性化して免疫を増強する発見。(図2)(金田)

9. HVJ-E ワクチンの安全性・毒性試験はラット・サルで問題なし。(中島)

D. 考察

1) 達成度について

- (1)HVJ-E/HSP65+IL-12+Ag85A+Ag85B+MPT51 DNA ワクチンはサルで強力な結核治療効果(生存率)を示し、当研究計画がほぼ十分に近く達成されたと考えられる。又、安全性・最適な投与方法を達成した。
- (2)さらに、HVJ-E/granulysin DNA ワクチンは1年後の長期生存率が良い治療効果をサルで示し、当研究計画が十分に達成されたと考えられる。
- (3)ワクチン皮下投与が結核治療効果を得て大きな進捗を得た。
- (4)化学療法剤INHと治療ワクチンを併用投与して、相乗的結核治療効果を発揮した結果は、臨床応用を考えると当研究計画を十分に達成した。
- (5)抗原特異的なCD4⁺およびCD8⁺T細胞応答を増強できる技術を確認し得た。

2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

- (1)我々のHSP65ワクチンはBCGよりも1万倍強力な結核予防ワクチン効果を発揮したことより、学術的・社会的意義が大きい(Clin. Devel. Immunol 2011)。
- (2)また、これらのワクチンは世界に先駆けて、ヒトの結核感染に最も近いカニクイザルモデルを用いて、結核治療ワクチン効果を発揮することを明らかにした。
- (3)世界に約50万人の多剤耐性結核患者が存在している。多剤耐性結核患者(特にXDR-TBやS・S多剤耐性結核)に対して、これらのワクチンが強力な治療法を提供する。

3) 今後の展望について

- (1)上記ワクチン治療サル群の引き続いての(1年以上)生存率、結核免疫解析。
- (2)ワクチンのPK(薬物動態)の解析。サルでの多剤耐性結核治療効果解析。
- (3)第I相臨床試験。

今後、上記の三つのワクチンを組み合わせた強力な治療ワクチン開発に大きな期待と展望が持てる。

E. 結論

1. より強力な結核治療ワクチンを開発するために、サルの系でHVJ-E/Ag85B+Ag85A+

MPB 51 DNA ワクチン及びHVJ-E/Gra DNA ワクチンを組み合わせ相乗的治療効果を解析した。

①結核菌気道感染28週後において、G2群のHsp65ワクチン+Ag85Aワクチン+Graワクチン治療群では4頭中3頭生存（生存率75%）であり、Tリンパ球の増殖増強を示した。一方G4群のコントロール群では4頭中1頭生存（生存25%）であった。すなわち、G2群のワクチンは極めて著明な結核治療効果を示した。

②結核菌チャレンジ1年間（365日）後ではG1のGraワクチン群が1頭生存。G3群のHsp65ワクチン+Ag85Aワクチン+Graワクチン治療群では2頭生存し、Graワクチンは1年近い生存率向上に大きく寄与することが示唆された。

2. マウスで結核治療効果を示したHVJ-E/HSP65DNA+IL-12DNAワクチンはカニクイザルでも強力な結核治療効果を発揮した。臨床応用へ向けてのプロジェクトが進展した。HVJ-E/HSP65 DNA + IL-12 DNA ワクチン治療群では、5頭中5頭100%の生存を示した。コントロール群の生食投与群は60%（5頭中3頭）の生存率であった。すなわち、HVJ-E/HSP65 DNA + IL-12 DNA ワクチンは著明な結核治療ワクチン効果を発揮した。（岡田 Vaccine 2009）
3. ワクチン皮下投与が結核治療効果を得て大きな進捗を得た。
4. 化学療法剤INHと治療ワクチンを併用投与して、相乗的結核治療効果を発揮した結果は、臨床応用を考えると当研究計画を十分に達成した。
5. SLPIワクチン及びGranulysinワクチンはマウスで結核治療効果を示した。結核菌病原性因子ESAT-6による自然免疫応答回避機構を明らかにした。またAIM2の結核感染防御における重要性を明らかにした。
6. HVJ-EはCTL, NK細胞の活性化とともに、制御性T細胞も局所で抑制できる。不活性化ウイルスに多彩な免疫活性化機能があることを証明したのはHVJ-Eが初めてである。さらにHVJ-Eは本来DDSとして開発されたように、遺伝子や蛋白質を培養細胞や生体組織に高効率で導入できる。
7. DNAワクチンを開発する上で課題となっている動物モデルとの種差を解決するためにカニクイザルの結核感染モデルによるワクチン作用の評価のために、アジュバント兼DDSであるHVJ-EのGMP製造・供給を完了した。また、今後の臨床応用に向け、GMP製造工程の信頼性を実証した。

また、臨床応用に必要な長期安定性を検討し、凍結乾燥による安定化により、冷蔵条件で21ヶ月の安定性を実証した。

8. より強力な抗結核サブユニット・ワクチンの開発を目指して、①ワクチン技術の開発と②潜伏期結核菌を標的としたワクチンの候補抗原の検索を平行して遂行し、以下の成果を得た。

HSP70のC末端側をMPB51/MPT51に融合させることより、抗原特異的なCD4⁺ T細胞応答を効率良く誘導できるワクチン技術を開発した。潜伏期の結核菌が特異的に発現するDosR蛋白質の抗原性をヒトおよびマウスで検討した。これまでに32種類について検討した結果、Rv2031がヒトおよびマウスで強い抗原性をもつことが確認できた。また、結核患者や健常者に比べ、Rv570、Rv2004、Rv2028c、Rv3133c等に対する免疫応答が潜伏感染者で亢進していることが明らかとなり、これらの抗原が潜伏期の結核菌を標的としたワクチンの候補抗原として有望と考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

- ① Okada M, Kita Y, Nakajima T, Kanamaru N, Hashimoto S, Nagasawa T, Kaneda Y, Yoshida S, Nishida Y, Nakatani H, Takao K, Kishigami C, Nishimatsu S, Sekine Y, Inoue Y, Matsumoto M, McMurray DN, E. C. Dela Cruz, E. V. Tan, R. M. Abalos, J. A. Burgos, Saunderson P, Sakatani M: Novel therapeutic vaccine: Granulysin and new DNA vaccine against Tuberculosis. Human Vaccines. 7:60-67, 2011
- ② Kita Y, Okada M, Nakajima T, Kanamaru N, Hashimoto S, Nagasawa T, Kaneda Y, Yoshida S, Nishida Y, Nakatani H, Takao K, Kishigami C, Nishimatsu S, Sekine Y, Takamori Y, McMurray DN, E. C. Dela Cruz, Tan EV, R. M. Abalos, J. A. Burgos, Saunderson P, Sakatani M.: Development of therapeutic and prophylactic vaccine against tuberculosis using monkey and granulysin transgenic mice models. Human Vaccines. 2011;7:108-114
- ③ Okada M, Kita Y, Nakajima T, Kanamaru N, Hashimoto S, Nagasawa T, Kaneda Y, Yoshida S, Nishida Y, Nakatani H, Takao K, Kishigami C, Nishimatsu S, Sekine Y, Inoue Y, McMurray DN, Sakatani M.: Novel prophylactic vaccine using a prime-boost method and hemagglutinating virus of Japan-envelope against tuberculosis. Clin Dev Immunol. 2011, ID549281
- ④ Okada M, Kita Y. Tuberculosis vaccine development: The development of novel

- (preclinical) DNA vaccine. *Human Vaccines*. 2010;6(4):297-308
- ⑤ 岡田全司. 結核“分子予防環境医学：生命科学研究の予防・環境医学への統合”(分子予防環境医学研究会編). 本の泉社2010;141-156
- ⑥ Okada M, Kita Y. Anti-tuberculosis immunity by cytotoxic T cells granulyisin and the development of novel vaccines (HSP-65 DNA+IL-12 DNA). *Kekkaku*. 2010;85(6):531-8.
- ⑦ Okada M. Immunity against Mycobacterium tuberculosis (introduction). *Kekkaku*. 2010;85(6):501-8.
- ⑧ 岡田全司. 感染・炎症・免疫 新たな結核ワクチン. 46-51, 2011
- ⑨ 岡田全司、喜多洋子、金丸典子、橋元里実、西田泰子、仲谷均、高尾京子、岸上知恵、西松志保、関根有紀. 新しい結核ワクチンの開発：小児の結核医療. *小児科*. 51:1243-1251, 2010
- ⑩ Okada M, Kita Y, Nakajima T, Kanamaru N, Hashimoto S, Nagasawa T, Kaneda Y, Yoshida S, Nishida Y, Nakatani H, Takao K, Kishigami C, Inoue Y, Matsumoto M, McMurray DN, Dela Cruz EC, Tan EV, Abalos RM, Burgos JA, Saunderson P, Sakatani M. Novel prophylactic and therapeutic vaccine against tuberculosis. *Vaccine*. 2009;27(25-26):3267-70.
2. 学会発表
- ① Okada M. A Novel Therapeutic Vaccine (HVJ-Envelope/HSP65 DNA+IL-12 DNA) Against Tuberculosis Using the Cynomolgus Monkey Model. Gordon Research Conferences, 3-8 Jul, 2011, Lucca, Italy.
- ② M Okada, T Nakajima, Y Kaneda, P Saunderson, E V. Tan. A Novel Therapeutic and Prophylactic Vaccines against Tuberculosis Using the Cynomolgus Monkey Model and Mouse Model. 5th Vaccine and ISV Annual Global Congress, 2-4 Oct, 2011, Seattle, USA.
- ③ M Okada, Y Kita, N Kanamaru, S Hashimoto, T Nakajima, Y Kaneda, P Saunderson, E V. Tan. Novel therapeutic vaccines against tuberculosis using the cynomolgus monkey model. 42th IUATLD (The International Union Against Tuberculosis and Lung Disease), 11-15 Nov, 2011, Lille, France.
- ④ Okada M, Kita Y, Kanamaru N, Hashimoto S, Nakajima T, Kaneda Y, E V. Tan, P Saunderson, Hayashi S. NOVEL VACCINES AGAINST TUBERCULOSIS AND DIFFERENTIATION OF CTL. 46th Tuberculosis and Leprosy Research Conferences. US-JAPAN Cooperative Medical Science. 124-128, 2011
- ⑤ 喜多洋子, 金丸典子, 井上義一, 林清二, 岡田全司. ヒト結核感染モデルに最も近いカニクイザルを用いた結核に対する新しい予防・治療ワクチン開発と免疫機構解析. *結核* 86 巻 3 号 Page385 (2011. 03)
- ⑥ Okada M. A Novel Therapeutic Vaccine (HVJ-Envelope/HSP65 DNA+IL-12 DNA) against Tuberculosis Using Monkey Models. in “Symposium: Host-Directed Therapies in Bacterial and Fungal Infections (Invited Speaker)” 50th ICAAC (International Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy), Sep 11-15, 2010, Boston, USA.
- ⑦ Okada M. Novel therapeutic vaccines (granulyisin and novel DNA vaccine) against Tuberculosis. 7th WCVII(WORLD CONGRESS ON VACCINE, IMMUNISATION AND IMMUNOTHERAPY) 2010 May 26-28 Berlin, Germany.
- G. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許取得
- ① 岡田全司、高森靖、小川一行、永田欽也
「感染症治療剤 15K granulyisin」 WO 03/070268 A1
2002年
- ② 岡田全司、吉田栄人、中島俊洋、松本真
「結核ワクチン HVJ-liposome/Hsp65 DNA+IL-12 DNA」
整理番号：MED-A0504
受付番号：50501768464
特許番号：特願2005-280379
提出日：2005年9月27日
発明の名称：DNAワクチン組成物
2005年
- ③ 岡田全司、高森靖、安井正文
「感染症治療剤15K granulyisin」
特許取得2008年7月4日
特許4149713号
2008年
2. 実用新案登録
3. その他