

G. 研究発表

1. 論文発表

Okamoto S, Yoshii H, Matsuura M, Kojima A, Ishikawa T, Akagi T, Akashi M, Takahashi M, Yamanishi K, and Mori Y: Poly- γ -glutamic acid nanoparticles and aluminum adjuvant used as an adjuvant with a single dose of Japanese encephalitis virus-like particles provides effective protection from Japanese encephalitis virus. Clin. Vaccine Immunol. 19: 17-22, 2012.

2. 学会発表

永田典代、岩田奈織子、早坂大輔、佐藤由子、小島朝人、佐多徹太郎、長谷川秀樹：BALB/c マウスを用いた脳炎関連フラビウウイルスの病原性の比較。第60回日本ウイルス学会学術集会、2012年11月、大阪。

H. 知的所有権の取得状況

1-1. 特許取得

特許第5027106号（登録日 平成24年6月29日）日本脳炎ウイルス抗原：特許権者 一般財団法人阪大微生物病研究会、国立感染症研究所長：発明者 小島朝人、倉田毅（国立感染症研究所）、石川豊数（財団法人阪大微生物病研究会 観音寺研究所）

1-2. 特許出願

1)国内特許出願(継続中)

特願 2009-540109 ウエストナイルウイルスワクチンおよびその製造方法：特許出願人 財団法人阪大微生物病研究会、国立感染症研究所長：発明者 小島朝人、高橋秀宗（国立感染症研究所）、石川豊数（財団法人阪大微生物病研究会）

特願 2007-330151 フラビウイルス感染症ワクチンおよびフラビウイルス感染症ワクチン用アジュバント：特許出願人 独立行政法人医薬基盤研究所、国立感染症研究所長、国立大学法人大阪大学、一般財団法人阪大微生物病研究会：発明者 小島朝人（国立感染症研究所）、石川豊数（一般財団法人阪大微生物病研究会）、ほか

2)国外特許出願(継続中)

“WEST NILE VIRUS VACCINE, AND METHOD FOR PRODUCTION THEREOF”, First Named Inventor: Asato Kojima、米国（12/741,479）、香港（11103342.6）、シンガポール（201003139-1）、ベトナム（1-2010-01414）、インド（3333/CHENP/2010）、欧州（08846317.9）、中国（200880115257.4）。

2. 実用新案特許

該当事項なし。

3. その他

該当事項なし。

細胞培養弱毒生痘そうワクチンの有効性、安全性の評価と生産性向上に関する総合的研究

国立感染症研究所
倉根一郎

研究要旨：H24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（LC16m8）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等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、長期保存による安全性、有効性の変化・推移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。弱毒生痘そうワクチンへの外来遺伝子発現システムの効率化が計られ、LC16m8をベースとしたワクチン開発に端緒を開くとともに、本ワクチンの性状解析に有効な手段となることが示された。さらに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。また、最近の天然痘ワクチン（ACAM2000）が使用されている米国からの副作用に関する文献を調査し、LC16m8が使用される場合に備えた情報を整備した。以上 1) 霊長類を含む動物モデルを用いた細胞培養弱毒生痘そうワクチン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、4) 安全性の評価や生産性の向上の観点から、ワクチン株を効率よく増殖させるための孵化鶏卵中の初代培養細胞系の構築、の大きな4項目の研究がなされた。特に本ワクチンが製造されてからの保管の期間とワクチン力価、含湿度試験等の成績を最大10年にわたり継続して実施し、品質に著明な変化がないことが確認された。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 東京農工大学農学部
水谷哲也
- ③ 国立保健医療科学院政策科学部
金谷泰宏
- 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

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。特にワクチン製剤の安定性および品質の維持、保管のあり方等の情報を取得するには、長期にわたる研究が必須である。本年度は以下の研究が実施された。

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

B. 研究方法

- 1) 痘そうワクチン接種の副作用報告と抗ウイルス薬による治療報告に関する文献調査。

PubMed 検索システムを用いて、「smallpox vaccine」，「adverse」等の単語をキーワードとして入力し、検索された文献の中から最近の

文献を精査した。天然痘ワクチン接種による副作用情報および治療に関する文献を選び、その情報をまとめた。

- 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検討。

危機管理対策として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、ワクチンの長期保管における安定性評価を行い、84箇月目まで力価及び含湿度を決定した。また、マーカー試験等の品質試験法の精度向上及び安定性試験等の品質試験の妥当性評価を継続した。生物基準及び検定基準における製造工程の試験項目の妥当性を評価し、基準改正に向けて検討を継続した。

- 3) LC16m8 の臨床評価に関する研究。

プロテインアレイを用いて LC16m8 により誘導される抗体プロファイルを作成し、既存免疫との交差性及び他のワクチニア株 (Dryvax, MVA 等) により誘導される抗体プロファイルとの比較を行った。

- 4) 痘瘡ワクチン Lister 株または LC16m8 株接種は霊長類個体におけるサル痘ウイルス感染時の排泄状況に関する研究。

細胞培養弱毒痘そうワクチン LC16m8 株または Lister 株の霊長類への一回接種により誘導されるサル痘ウイルス感染症予防効果を、血液および咽頭スワブ検体からのサル痘ウイルス排出状況をウイルス分離検査により解析した。

- 5) 痘そうワクチン LC16m8 接種者における中和抗体持続に関する調査研究。

細胞培養弱毒生痘そうワクチン LC16m8 を 1 回接種された成人被接種者が獲得した中和抗体の持続を調査するために、化血研が種痘歴の無い健康成人を被験者として 2004~2005 年に米国で実施した第 VII 相臨床試験成績を再解析した。

- 6) 劇症型サル痘発症機序の解明に関する研究。

サル痘ウイルス実験的感染カニクイザルのうち、劇症化した 2 個体のリンパ系組織における病理像の特徴を明らかにした。

- 7) 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、安全性と有効性を解析した。

- 8) LC16mO, m8 株の任意の遺伝子の効率良い組換え法の開発と応用。

容易に外来の遺伝子を導入するシステム、ワクチニアウイルスのコードする遺伝子を亜型の異なるワクチニアウイルスと入れ替えた

キメラウイルスを作成するシステムの確立した。

- 9) 痘そうワクチン LC16m8 接種者における中和抗体持続に関する調査研究。

細胞培養弱毒生痘そうワクチン LC16m8 を 1 回接種された成人被接種者が獲得した中和抗体の持続を調査した。

- 10) 鶏卵等の初代培養細胞を用いた痘そうワクチンの感受性試験システムの構築に関する研究。

孵化鶏卵の神経細胞の初代培養細胞系を構築することを目的とした。また、本研究では鶏以外の神経細胞として、オウムにおいても初代培養細胞系の構築を試みた。

【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た。

C. 研究結果

- 1) 痘そうワクチン接種の副作用報告と抗ウイルス薬による治療報告に関する文献調査。

米国では米軍兵士に対して天然痘ワクチン (ACAM2000) が接種されているが、いくつかの重症合併症の報告がなされている。また、Siga Technologies 社 (4575 SW Research Way Suite 230, Corvallis, OR 97333, United States) により開発された天然痘に対する新規抗ウイルス薬 (ST-246) は、天然痘だけでなく天然痘ワクチンによる副作用に対しても有用と考えられている。天然痘ワクチン接種による副作用として、心筋炎・心外膜炎や重症皮膚感染症、接触者への感染拡大等が報告されている。また、これらの感染症に対して有効と考えられる ST-246 が、重症天然痘ワクチン感染症患者への使用例が報告された。

- 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い、84 箇月目まで力価及び含湿度を保持していることを確認した。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。原液の長期保管における安定性評価を行い、48 箇月目まで安定であることを確認した。添加剤についても、10 年間冷蔵保管した検体で毒性等の変化は認められず、安定であることを確認した。

3) LC16m8 の臨床評価に関する研究.

プロテインアレイを用いて LC16m8 により誘導される抗体プロファイルを作成し、既存免疫との交差性及び他のワクチニア株 (Dryvax, MVA 等) により誘導される抗体プロファイルとの比較を行ったところ、LC16m8 は、他のワクチニア株とほぼ共通した抗原性を有する事を確認し、天然痘回復血清との比較においても B5R を除く全ての抗原パターンで一致を認めた。一方、B5R と同様の EV 抗原である A33, 34, 36 に対する抗体誘導を有することが指摘され、これが LC16m8 の高い中和抗体活性に関与していると示唆された。

4) 痘瘡ワクチン Lister 株または LC16m8 株接種の霊長類個体におけるサル痘ウイルス感染時の排泄状況の解析.

霊長類に痘瘡ワクチン接種すると、サル痘発症予防効果が認められるものの、サル痘ウイルスの排出が認められたことから、完全な感染予防は不可能であることが明らかにされた。また、LC16m8 接種個体の中には、血液からのサル痘ウイルス分離陽性個体 (6 個体中 1 個体) があり、一方、Lister 株接種 4 個体の血液からサル痘ウイルスが分離されていない。個体数が少なく、この成績から LC16m8 株と Lister 株が誘導する防御効果を比較することはできないが、LC16m8 株の霊長類における重症サル痘ウイルス感染症予防効果は Lister 株のそれよりも若干劣る可能性が示唆された。

5) 痘そうワクチン接種用法並びに痘そうワクチン LC16m8 接種者における中和抗体持続に関する調査研究.

化血研が種痘歴の無い健康成人を被験者として 2004~2005 年に米国で実施した第 I/II 相臨床試験成績を再解析したところ、抗体陽性率は接種 30 日後に LC16m8 群では 98%、Dryvax 群では 100%であったが、接種 360 日後ではそれぞれ 84%、88%となり、ワクチン株に関係無く陽転率低下の可能性が示唆された。

6) 劇症型サル痘発症機序の解明に関する研究.

劇症型サル痘個体では、典型的な発疹所見を示さず、13 日以内に瀕死となった個体である。いずれの個体も、リンパ節・胸腺においてリンパ球は減少し、特に、脾の B 領域を中心とした濾胞全体の壊死は重度であった。骨髄では骨髄芽球の減少と壊死が認められた。15 日以降に重症化した個体では脾、骨髄の病変は比較的軽度であることから、これらの免疫中枢組織における病変形成 (強い免疫不全

状態) が、病態に大きく関与することが病理学的に明らかになった。

7) LC16m8, m8 株の任意の遺伝子の効率良い組換え法の開発と応用に関する研究.

薬剤耐性遺伝子とセレクションマーカー遺伝子及び外来遺伝子を組み換えた中間体を選択し、その後薬剤非存在下で薬剤耐性遺伝子とセレクションマーカー遺伝子が相同組換えにより脱落することにより、LC16m8 株の任意の遺伝子を効率よく組換えることのできる系を開発した。この系を応用して、アレナウイルスの構造遺伝子を発現する組換えワクチニアウイルスを作製した。

8) 痘そうワクチン LC16m8 接種者における中和抗体持続に関する調査研究.

LC16m8 を 1 回接種された成人被接種者が獲得した中和抗体の持続を調査したところ、抗体陽性率は接種 4 ヶ月後までに初種痘群では 100%、再種痘群では 92%であったが、接種後約 4 年経過した時点の陽性率は再種痘群では 93%と同等であったのに対し、初回種痘群では 60%となり低下傾向が認められた。

9) 鶏卵等の初代培養細胞を用いた痘そうワクチンの感受性試験システムの構築.

鶏とオウム (オカメインコ) の孵化卵から神経細胞の初代培養細胞の構築に成功した。

D. 考察

1) LC16m8 株の有効性と副作用に関する研究.

これまでの研究により LC16m8 株 1 回接種によりサル痘発症予防効果が少なくとも 1 年間は低下することなく持続することが明らかにされている。その効果をウイルス分離成績から LC16m8 接種によるサル痘予防効果を、Lister 株のそれと比較した。サル痘ウイルス接種部位でさえ皮膚病変が出現せず、感染を高度に予防しているものと考えられた Lister 株接種個体でも、LC16m8 個体でも、サル痘ウイルス接種後 11 日目以降の咽頭スワブからサル痘ウイルスが分離されたことから、サル痘ウイルス感染症を完全に予防することができないことが明らかにされた。しかし、そのウイルス量は極めて少なく、それが原因で感染が広がるリスクは低いと考えられる。すくなくとも LC16m8 接種個体でも血液中に感染性サル痘ウイルスが存在することが明らかにされた。

劇症型サル痘発症機序を病理学的に解析した。個体も、皮膚の発疹所見は、天然痘患者の臨床症状分類のうち、「扁平型」に類似する。劇症型サル痘発症の要因は、脾、免疫不全状態、特に骨髄低形成による好中球低下症が関連し

ていると推察している。今後の検討課題として、好中球の皮膚発痘の病態形成における関わり、接種経路と脳炎発症機序の関係の解明が挙げられる。

文献検索により米国で使用されている天然痘ワクチン ACAM2000 の副作用情報を収集した。ACAM2000 接種を受けた米国軍人およびその接触者からの報告であった。重度の副作用報告から、心機能障害（心筋炎・心外膜炎）、そして、自己接種による結膜炎や性的パートナーに発生した生殖器での病変等であった。比較的重度の副作用報告もあり、改めて安全なワクチンの必要性が確認された。

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。

本研究で行った国内外の文献調査の結果、天然痘流行期及び現行の米国承認備蓄痘そうワクチン(ACAM2000)の接種用法では、特に天然痘曝露に対する最大限の防御レベルが要求される人については毎年、少なくとも3年間隔での追加接種を推奨していることが明らかとなった。一方、現在天然痘テロに対する危機管理対策として通常1回接種されている細胞培養弱毒痘そうワクチン LC16m8 については、天然痘対応指針（第5版）や添付文書等に追加接種に関する規定が無いため、今後専門家による検討を踏まえた整備が必要であると考えられる。

154名の種痘歴の無い健康成人において2004～2005年に米国で実施された第I/II相臨床試験で取得された成績を再解析した。中和抗体価及び抗体陽性率はLC16m8群とその比較対照としたDryvax群ともに接種30日後に最高値となり、その後接種360日後まで徐々に低下した。なお、中和抗体価及び抗体陽性率の低下傾向はワクチン株に関係無く確認されたことから、LC16m8株という弱毒株に特有の現象ではないと考えられる。

LC16m8を1回接種された成人被接種者が獲得した中和抗体(Anti-Lister PRNT₅₀)の持続を調査した。種痘歴に関係なく、抗体価(PRNT₅₀ GMT)は種痘4ヵ月後に最高値となり約4年後には1ヵ月後と同等の値となる推移を示した。一方、抗体陽性率については再種痘群では抗体陽性率に経時的な変化は認められなかったが、初種痘群では低下傾向が認められた。今回確認された初種痘群の抗体陽性率の低下傾向は被験者数5名という少ないサンプル数で確認されたことであり、今後も被験者数を増やし更に慎重に検証していく必要があると考えられる。なお、横手らの米国で

行った痘そうワクチン LC16m8 の第1相臨床試験でも同様の成績が得られており、LC16m8 のもつ弱毒株に特有の現象ではないと考えられる。

LC16m8 接種者におけるワクチニアウイルスの各種抗原に対する抗体誘導について、プロテオミック解析により明らかにした。LC16m8 株において、切断型と想定される B5 抗原による初接種群に対する抗体誘導は予想通り認められなかったが、A33 などの他の EV 抗原に対する抗体の産生は確認された。防御には、MV, EV の両方に対する抗体の存在が重要であることが報告されており、この点において、LC16m8 株接種血清の抗体プロファイルは MV に対する抗体と同様に、B5 以外の EV 抗原に対する抗体を誘導しており、動物実験や野生株を用いた実験において LC16m8 株が防御能を示すことを抗原性の面から支持する結果であると考えられる。中和抗原に対する抗体産生、MV, EV の抗原に対する抗体産生、並びに、Dryvax 株接種血清、MVA 株接種血清、天然痘回復期血清との抗原の共通性からも LC16m8 株の抗原性の面における有効性が示唆された。

3) 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℃以下で保存した場合、長期(120ヵ月)にわたる保管後においても、力価、含湿度、有効成分等において品質の低下が認められないことが確認された。84箇月目まで力価の変化は認められず、その他の規格試験もいずれも適合であることから、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、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℃以下で保存した場合、保管後120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。

ワクチン原液においても同様の成績が得られている。添加剤については、10℃以下の冷蔵保存でも少なくとも、保管後120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が行われることを想定し、安全性、有効性を評価する追加試験等の評価系の検討等を今後も継続する必要があると考えられる。

生産性向上およびに寄与できるものと考えられる。品質管理試験の精度向上検討として、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継続している。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、基準からの削除の方向で、その可能性について検討を継続する必要がある。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。

4) LC16m8 に外来遺伝子を導入する新たな方法の開発等に関する研究

LC16mO, m8 株の任意の遺伝子の効率良い組換え法が確立された。この方法を駆使することにより、LC16m8 の弱毒化、温度感受性原因遺伝子の特定等の研究に応用できる。さらには、比較的安全と考えられている LC16m8 をベクターとしたワクチン開発に応用が可能となる。

鶏とオウム（オカメインコ）の孵化卵から神経細胞の初代培養細胞の構築に成功した。今回作製した細胞が神経細胞以外にどのような細胞種を含む細胞群であるかについては、さらに特異的マーカーを用いた細胞種の特定をおこなわなければならないが、この技術を応用して漿尿膜の初代培養細胞の作製もおこない、痘そう生ワクチンがこれらの初代神経細胞に感染できるかについての検討することが可能となる。

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（劇症型サル痘発症病理および LC16m8 のサル痘発症予防における感染防御能）、ヒトに接種された際の中和抗体価の推移、抗体誘導における抗原の探索、ワクチン製剤の安定性等、新たな知見が蓄積された。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。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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
- 2) Kishimoto S, Ishihara M, Nakamura S, Fujita M, Takikawa M, Sumi Y, Kiyosawa T, Sato T, Kanatani Y. Fragmin/protamine microparticles to adsorb and protect HGF and to function as local HGF carriers in vivo. *Acta Biomater* 9(1):4763-4770, 2013
- 3) Yoshikawa T, Morikawa S, Saijo M. Emergence of zoonotic orthopoxvirus infections. In “Viral Infections and Global Changes” edited by Singh, SK, John Wiley & Sons, in press
- 4) Sakai K, Nagata N, Ami Y, Seki F, Suzaki Y, Iwata-Yoshikawa N, Suzuki T, Fukushi S, Mizutani T, Yoshikawa T, Otsuki N, Kurane I, Komase K, Yamaguchi R, Hasegawa H, Saijo M, Takeda M, Morikawa S. Lethal canine distemper virus outbreak in cynomolgus monkeys in Japan in 2008. *J Virol* 87(2):1105-1114, 2013
- 5) Sharma N, Hotta A, Yamamoto Y, Fujita O, Uda A, Morikawa S, Yamada A, Tanabayashita K. Detection of *Francisella tularensis*-specific antibodies in patients with tularemia using a novel competitive enzyme-linked immunosorbent assay. *Clin Vaccine Immunol* 20(1):9-16, 2013
- 6) Taniguchi S, Sayama Y, Nagata N, Ikegami T, Miranda ME, Watanabe S, Iizuka I, Fukushi S, Mizutani T, Ishii Y, Saijo M, Akashi H, Yoshikawa Y, Kyuwa S, Morikawa S. Analysis of the humoral immune responses among cynomolgus macaque naturally infected with Reston virus during the 1996 outbreak in the Philippines. *BMC Vet Res* 8(1):189, 2012
- 7) Fukushi S, Tani H, Yoshikawa T, Saijo M, Morikawa S. Serological assays based on recombinant viral proteins for the diagnosis of arenavirus hemorrhagic fevers. *Viruses* 4(10):2097-2114, 2012
- 8) Katano H, Sato S, Sekizuka T, Kinumaki A, Fukumoto H, Sato Y, Hasegawa H, Morikawa S, Saijo M, Mizutani T, Kuroda M. Pathogenic characterization of a cervical lymph node derived from a patient with Kawasaki disease. *Int J Clin Exp Pathol* 5(8):814-823, 2012
- 9) Sayama Y, Demetria C, Saito M, Azul RR, Taniguchi S, Fukushi S, Yoshikawa T, Iizuka I, Mizutani T, Kurane I, Malbas FF Jr, Lupisan S, Catbagan DP, Animas SB, Morales RG, Lopez EL, Dazo KR, Cruz MS, Olveda R, Saijo M, Oshitani H, Morikawa S. A seroepidemiologic study of Reston ebolavirus in swine in the Philippines. *BMC Vet Res* 8:82, 2012
- 10) Lihoradova O, Kalveram B, Indran SV, Lokugamage N, Juelich TL, Hill TE, Tseng CT, Gong B, Fukushi S, Morikawa S, Freiberg AN, Ikegami T. The dominant-negative inhibition of double-stranded RNA-dependent protein kinase PKR increases the

- efficacy of Rift Valley fever virus MP-12 vaccine. *J Virol* 86(14):7650-661, 2012
- 11) Tani H, Morikawa S, Matsuura Y. Development and Applications of VSV vectors based on cell tropism. *Front Microbiol* 2:272, 2011
 - 12) 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* 424(2):99-105, 2012
 - 13) 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(1):40-44, 2012
2. 学会発表
- 1) 吉河智城, 飯塚愛恵, 谷英樹, 福士秀悦, 倉根一郎, 西條政幸, 森川茂. 細胞培養痘そうワクチンの製造株であるワクチニアウイルス LC16m8の親株LC16m0の遺伝子安定性. 第16回日本ワクチン学会学術総会, 横浜 (2012.11)
 - 2) 江藤亜紀子, 齋藤智也, 藤井達也, 横手公幸, 金谷泰宏. プロテインアレイを用いた天然痘ワクチンLC16m8株接種血清における抗体プロファイルの解析. 第16回日本ワクチン学会学術集会, 横浜 (2012.11)
 - 3) 吉河智城, 飯塚愛恵, 谷英樹, 福士秀悦, 倉根一郎, 西條政幸, 森川茂. 細胞培養痘そうワクチンの製造株であるワクチニアウイルス LC16m8の親株LC16m0の遺伝子安定性. 第16回日本ワクチン学会学術総会, 横浜 (2012.11)
 - 4) Shinmura Y, Uemura C, Kanehara T, Maruno S, Matsui H, Ohkuma K, Yokote H, Yokoi K, Funatsu A, Gordon S, Franchini G, Hashizume S. LC16m8, an attenuated smallpox vaccine will be a useful countermeasure against bio-terrorism with smallpox. 2012 ASM Biodefense and Emerging Diseases Research Meeting. Washington D.C, USA (2012.02)
 - 5) Shinmura Y, Uemura C, Kanehara T, Maruno S, Matsui H, Ohkuma K, Yokote H, Yokoi K, Funatsu A, Gordon S, Franchini G, Silvera P, Hashizume S. LC16m8, An attenuated smallpox vaccine will be a useful countermeasure against bio-terrorism with smallpox. XIX International Poxvirus, Asfarvirus & Iridovirus Conference. Salamanca, Spain (2012.06)
 - 6) 新村靖彦, 上村千草, 金原知美, 丸野真一, 松井元, 横手公幸, 横井公一, Gordon S., Franchini G., 橋爪壮. ワクチニアウイルスの病原性発現抑制における液性免疫及び細胞性免疫の関与. 第60回日本ウイルス学会学術集会 大阪 (2012.11)
 - 7) Kanehara T., Maruno S., Frey S., Greenberg R., Yokote H. Safety and immunogenicity assessment of attenuated smallpox vaccine LC16m8 in vaccinia-naive adults in the U.S. 第16回日本ワクチン学会学術集会 横浜 (2012.11)
 - 8) 新村靖彦, 上村千草, 丸野真一, 森川茂, 西條政幸, J. Kennedy, K. Karem, I. Damon, 横手公幸. 米国臨床試験における弱毒痘そうワクチンLC16m8による液性免疫及び細胞性免疫の評価. 第16回日本ワクチン学会学術集会 横浜 (2012.11)
 - 9) 江藤亜紀子, 齋藤智也, 藤井達也, 横手公幸, 金谷泰宏. プロテインアレイを用いた天然痘ワクチンLC16m8株接種血清における抗体プロファイルの解析. 第16回日本ワクチン学会学術集会 横浜 (2012.11)
 - 10) 永田典代, 佐藤由子, 岩田奈織子, 鈴木忠樹, 佐多徹太郎, 長谷川秀樹. サル痘ウイルス感染後カニクイザルにおける劇症化の病態解析. 第101回日本病理学会, 東京 (2012. 4)
- 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

遺伝子組換えBCGを用いた新規結核ワクチンの開発

独立行政法人医薬基盤研究所
霊長類医科学研究センター
保富 康宏

研究要旨 結核の制圧は、世界の保健医療分野の最重要課題の一つである。BCGワクチンは、小児結核には効果があるが成人の肺結核に対する明確な予防効果は認められないことから、新規ワクチン開発は急務である。本研究では、BCGなど抗酸菌の宿主免疫反応を負に調節するサイトカイン抑制分子(SOCS)のアンタゴニストとして働くSOCS1変異体(1アミノ酸置換)(SOCS1dn)を組み込んだBCG(rBCG-SOCS1DN)を用い新たな結核ワクチンの開発研究を行った。

研究分担者

松尾和浩：日本BCG研究所

松本壮吉：大阪市立大学大学院医学研究科

梅村正幸：琉球大学熱帯生物圏研究センター

A. 研究目的

結核は世界中で毎年930万人の新規患者の発生が認められる。わが国では2万5千人以上の患者の発生があり、世界的には結核中度蔓延国である。結核に対する唯一のワクチンであるBCGは、小児の結核性髄膜炎ならびに粟粒結核に対しては80%の防御効果を示しているが、成人の肺結核に対して明確な予防効果は認められない。これらのことから、新規ワクチン開発は急務であり、わが国はもとより、世界的な重要課題である。本研究では、わが国で現在用いられているBCGに、BCG等の抗酸菌に対する宿主免疫反応を負に調節するサイトカイン抑制分子(SOCS)に対し拮抗的に働く変異体分子を挿入し、その免疫原性を高め、成人にも効果が認められる新規結核ワクチンの開発を行う。

B. 研究方法

(保富康宏)

rBCG-SOCS1DNの増殖性と免疫誘導効果を検討した。

(松尾和浩)

rBCG-SOCS1DN免疫マウスにおける結核菌噴霧感染に対する効果を検討した。

(松本壮吉)

rBCG-SOCS1DN免疫によって誘導される抗体産生について検討した。

(梅村正幸)

rBCG-SOCS1DN肺内投与における肉芽腫とサイトカイン産生について検討した。

C. 研究結果

(保富康宏)

rBCG-SOCS1DNは既存のBCG以上に強力な免疫反応を誘導し、安全性も高いことが示された。

(松尾和浩)

rBCG-SOCS1DNは強毒結核菌Kurono株の噴霧感染系において、マウス脾臓での菌数を既存のBCGに比較し有意に低下させられることがわかった。

(松本壮吉)

主要な結核菌抗原を33種類、調整し精製した。また一部の抗原に対して、rBCG-SOCSdn免疫により抗体応答が生じており、65 kDa、30 kDa、28 kDaの蛋白質に顕著な反応が認められた。

(梅村正幸)

rBCG-SOCSdn接種による肺組織の病態形成への影響は現行ワクチンと相違ないものの、その後の結核菌抗原特異的なTh1免疫応答を増強することが明らかになった。

D. 考察

新たな抗結核ワクチンとしてBCGを用いる試みとしては抗原分子の過剰発現やサイトカイン遺伝子等の組み込みが行われている。本研究ではこのような一部の抗原や単一のサイトカインを誘導するという手法ではなく、新たな試みとしてBCG等の抗酸菌に対する宿主免疫反応を負に調節するサイトカイン抑制分子 (SOCS) に着目した。

本研究で用いたrBCG-SOCSdnは既存のBCG以上に抗結核免疫の誘導が行われ、現在開発中の種々の組み換えBCG以上の効果が期待される。

E. 結論

rBCG-SOCSdnは既存のBCG以上に強力な免疫反応を誘導し、安全性かつ効果的なワクチンになり得ることが期待される。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

論文発表

<保富>

1)Yoshida, T., Omatsu, T., Saito, A., Katakai, Y., Iwasaki, Y., Kurosawa, T., Hamano, M., Higashimo, A., Nakamura, S., Takasaki, T., Yasutomi, Y., Kurane, I. and Akari, H. Dynamics of cellular immune responses in the acute phase of dengue virus infection. *Archiv. Virol.* in press

2) Tougan, T., Aoshi, T., Coban, C., Katakai, Y., Kai, C., Yasutomi, Y., Ishii, K. J. and Horii, T. TLR9 adjuvants enhance immunogenicity and protective efficacy of the SE36/AHG malaria vaccine in nonhuman primate models. *Hum. Vac. Immunother.* 2012 in press

3) Karamatsu, K., Matsuo, K., Inada, H., Tsujimura, Y., Shiogama, Y., Matsubara, A., Kawano, M. and Yasutomi, Y. Single systemic administration of Ag85B of mycobacteria DNA inhibits allergic airway inflammation in a mouse model of asthma. *J Asthma Allergy* 2012;5:71-79.

4) Nomaguchi, M., Yokoyama, M., Kono, K., Nakayama, E. E., Shioda, T., Saito, A., Akari, H., Yasutomi, Y., Matano, T., Sato, H. and Adachi, A. Gag-CA Q110D mutation elicits TRIM5-independent enhancement of HIV-1mt replication in macaque cells. *Microve. Infect.* in press

5) Yoshida, T., Omatsu, T., Saito, A., Katakai, Y., Iwasaki, Y., Iijima, S., Kurosawa, T., Hamano, M., Nakamura, S., Takasaki, T., Yasutomi, Y., Kurane, I. Akari, H. CD16 positive natural killer

cells play a limited role against primary dengue virus infection in tamarins Archives Virol 2012;15::363-368.

6) Tajiri,K., Imanaka-Yoshida,K., Matsubara, A., Tsujimura,Y., Hiroe,M., Naka,T.,Shimojo, N., Sakai,S., Aonuma,K. and Yasutomi,Y. S uppressor of cytokine signaling 1 (SOCS1) DNA administration inhibits inflammatory a nd pathogenic responses in autoimmune my ocarditis. J.Immunol 2012;189;2043-2053.

7) Uchida,A., Sasaguri,H., Kimura,N., Tajir i,M., Ohkubo,T., Ono,F., Sakaue,F., Kanai, K., Hirai,T., Sano,T., Shibuya,K., Kobayashi, M., Yamamoto,M., Yokota,S., Kuboddera,T., Tomori,M., Sakaki,K., Enomoto,M., Hirai, Y., Kumagai,J., Yasutomi,Y., Mochizuki,H., Kuwabara,S., Uchihara,T., Mizusawa,H. and Yokakota,T. Non-human primate model of ALS with cytoplasmic mislocalization of T DP-43. Brain 2012;135;833-846.

8) Saito,A., Kono,K., Nomaguchi,M., Yasuto mi,Y., Adachi,A., Shioda,T., Akari,H. and N akayama,E. E. Geographical genetic and fun ctional diversity of antiretroviral host factor

TRIMCyp in cynomolgus macaque (Macac a fascicularis). J.Gen.Virol. 2012;93:594-602.

9) Higashino,A., Sakate,R., Kameoka,Y., Ta kahashi,I., Hirata,M., Tanuma,R., Masui,T., Yasutomi,Y. and Osada,N. Whole-genome s equencing and analysis of the Malaysian cy nomolgus macaque (Macaca fascicularis) ge nome. Genome Biol. 2012 Epub

10) Tachibana,S., Sullivan,SA., Kawai,S., Nakamura,S., Goto,N., Arisue,N., Palacpac,N MQ., Honma,H., Yagi,M., Tougan,T., Katak ai,Y., Kaneko,O., Mita,T., Kita,K., Yasutomi,

Y., Kim,HR., Sutton,PL., Shakhbatyan,R., H orii,T., Yasunaga,T., Bamwell,JW., Escalante, AA., Carlton,JM. And Tanabe,K. Plasmodiu m cynomolgi genome sequences provide ins ight into Plasmodium vivax and the monkey malaria clade. Nature Genetics 2012; 44:10 51-105

<松尾>

1) Karamatsu K, Matsuo K, Inada H, Tsuji mura Y, Shiogama Y, Matsubara A, Kawan o M, Yasutomi Y. Single systemic administ ration of Ag85B of mycobacteria DNA inhi bits allergic airway inflammation in a mous e model of asthma. J. Athma and Allergy 2 012;5, 71-79 (2012)

<松本>

1) Fukuda, T., T. Matsumura, M. Atob, Y. Nishiuchi, Y. Murakamia, Y. Maedaa, T. Yoshimori, S. Matsumoto, K. Kobayashi, T. Kinoshita, and Y. Morita. 2013 in press.

Critical Roles of Mycobacterial Lipomannan and Lipoarabinomannan in Antibiotic Resistance and Pathogenesis. mBio.

2) Tateishi, Y., S. Kitada, K. Miki, R. Maekura, Y. Ogura, Y. Ozeki, Y. Nishiuchi, M. Niki, T. Hayashi, K. Hirata, K. Kobayashi, and S. Matsumoto. 2012. Whole-Genome Sequence of the Hypervirulent Clinical Strain *Mycobacterium intracellulare* M.i.198. J Bacteriol 194:6336.

3) Tamaru, A., C. Nakajima, T. Wada, Y. Wang, M. Inoue, R. Kawahara, R. Maekura, Y. Ozeki, H. Ogura, K. Kobayashi, Y. Suzuki, and S. Matsumoto. 2012. Dominant Incidence of Multidrug and Extensively Drug-Resistant Specific *Mycobacterium tuberculosis* Clones in Osaka Prefecture,

Japan. PLoS One 7:e42505.

4) Osada-Oka, M., Y. Tateishi, Y. Hirayama, Y. Ozeki, M. Niki, S. Kitada, R. Maekura, K. Tsujimura, Y. Koide, N. Ohara, T.

Yamamoto, K. Kobayashi, and S. Matsumoto. 2012. Antigen 85A and Mycobacterial DNA-binding protein 1 are targets of IgG in individuals with past tuberculosis. *Microbiol Immunol* In press.

5) Niki, M., M. Niki, Y. Tateishi, Y. Ozeki, T. Kirikae, A. Lewin, Y. Inoue, M. Matsumoto, J. L. Dahl, H. Ogura, K. Kobayashi, and S. Matsumoto. 2012. A novel mechanism of growth phase-dependent tolerance to isoniazid in mycobacteria. *J Biol Chem* 287:27743-27752.

6) Fujii, J., M. Naito, T. Yutsudo, S. Matsumoto, D. P. Heatherly, T. Yamada, H. Kobayashi, S. Yoshida, and T. Obrig. 2012. Protection by a Recombinant *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette-Guerin Vaccine Expressing Shiga Toxin 2 B Subunit against Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* in Mice. *Clin Vaccine Immunol* 19:1932-1937.

<梅村>

1) Umemura, M., Okamoto-Yoshida, Y., Yahagi, A., Touyama, S., Nakae, S., Iwakura, Y., and Matsuzaki, G.: Involvement of IL-17A-producing TCR $\gamma\delta$ T cells in late protective immunity against pulmonary *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Int. Immunol.*: Pending revision (2013)

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

1) 「新規な組換えBCGワクチン」

PCT/JP2012/073213 国際特許申請中

血球凝集素抗原（HA）の立体構造予測に基づく型特異的および型共通抗インフルエンザウイルス抗体の作成と迅速診断法の確立

国立感染症研究所 免疫部
横田 恭子

研究要旨：

H5型インフルエンザウイルスのHA2領域に立体構造保持フレームを付与したP8A-K38ペプチドはHAとの反応性が増強した。コンピューター予測した型共通ペプチドに対するモノクロー抗体のスクリーニングのため、ウイルス抗原を適度に変性させる界面活性剤濃度を決定した。細胞にHAを発現させる系の確立はこれら新規抗体の立体構造認識確認に役立つ。また、感度が向上した改良型H5検出キットは、ベトナムの臨床検体のH5HAを90割程度検出した。

研究分担者

- (1) 国立感染症研究所
インフルエンザウイルス研究センター
影山 努
- (2) 国立感染症研究所 免疫部 大西和夫
- (3) 東洋紡（株）敦賀バイオ研究所
西村 研吾

（委託研究）

国立感染症研究所 免疫部 横田恭子

A. 研究目的

HA立体構造予測に基づいてインフルエンザウイルスを検出する型特異的・型共通抗体を作製し、より感度と特異性の高い検出キットを開発し、臨床現場で実用性の高いインフルエンザ簡易迅速診断法の確立をめざす。

B. 研究方法

- 1) インフルエンザウイルスのヘムアグルチニン分子（HA）について、H1、H2、H3、H5の型共通エピートおよび型特異的エピートについて独自のバイオインフォマティクス手法を用いて探索し、特定した候補エピート領域の立体構造について *in silico* 予測を行ない、選択したペプチドをマウスに免疫した（大西）。
- 2) 昨年度バイオインフォマティクスに基づ

いてペプチド免疫して作製したモノクローナル抗体活性をELISAで測定する系の検討を行った。A/VietNam/1194/2004(H5N1)由来NIBRG-14株をウイルス抗原とし、終濃度0.005, 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1%となるようにSDSを添加して250ng/wellでコーティングし、ブロッキング後、各濃度のSDSを添加した抗体と反応させた。洗浄後、 α -mouse IgG HRPにも各濃度のSDSを添加し、これを用いて二次抗体反応を行い、吸光度を測定した（影山）。

3) ドキシサイクリン(Dox)制御性HA発現細胞の確立のため用いたH5N1ウイルスのHA遺伝子の株はA/VietNam/1194/2004, A/VietNam/1203/2004, A/Indonesia/5/2005, A/Turkey/12/2006, A/Anhui/01/05IBCDC-RG-5である。これらをレンチウイルスベクターに組み込み、フローサイトメトリーあるいはウエスタンブロットでその発現を解析した（横田）。

4) H5HAキットの感度を増強するため、2つの抗体の量比、反応容器での保持液量（トランスファー量）、反応時間、前処理液組成、抗体組合せ、前処理量について検討した。国立感染研究所にPOCUBEおよびこの検討により改良したキットを持ち込み、クレードの異なる4種類の不活化ウイルス液（Clade 1, 2.1, 2.2, 2.3）について感度・特異性、交差反応性を評価し、従来キットと比較した（西村）。

5) ハノイのベトナム国立衛生疫学研究所

(National Institute of Hygiene and Epidemiology: NIHE)の Dr. May ウイルス部長およびホーチミン市のパスツール研究所(HCM Pasteur)の Dr. Long 部長との共同研究により、それぞれに凍結保存されている合計 19 検体の咽頭あるいは鼻ぬぐい液を用いて POCube による H5HA 検出試験を行った(影山、横田)。

(倫理面への配慮)

当該施設における倫理委員会や実験動物委員会の承認を得た上で実施した。

C. 研究結果

1) これまでインフルエンザウイルスの HA 分子について論文報告された型共通アミノ酸配列のうちの多くは多量体形成に関与する部位であり、多量体形成に関与しない場合はほとんどが糖鎖による修飾部位の近傍にあるため、抗体のアクセスが阻害されていることが明らかとなった。そこで、三量体分子表面に露出されるアミノ酸配列が多量体形成に関与せず、糖鎖修飾も受けないと予想され、かつ亜型 (H1、H3、H5) 間でアミノ酸配列が高度に保存されている分子領域の型共通エピトープペプチドを合成して抗体を作製している。一方、これら抗原ペプチドの抗原性には立体構造が重要であることが示唆されたことから、HA2 領域の α -ヘリックスを含む K38 ペプチドとその N 末と C 末両末端をポリプロリンで結び環状化させた P8A-K38 ペプチドを BALB/c マウスに免疫してその免疫原性を調べた結果、ブースト後 4 日目と 8 日目の血清中 IgM および IgG のいずれも、十分な抗体価を有していた。これらの血清と不活化ウイルス全粒子ワクチンとの反応性を調べた結果、P8A-K38 ペプチドはウイルス粒子との反応性が高いことが明らかとなった。

2) M1 抗原を標的としたモノクローナル抗体では SDS を 0.01% 添加時に最も反応性が高くなり、H5 HA 抗原を標的とした 2 つのモノクローナル抗体(H5 7D4, H5 7D6)では SDS を 0.05% 添加時に最も反応性が高くなった。しかしながら、H5 HA 抗原を標的としたもう一つのモノクローナル抗体(H5 5A7)では、SDS 濃度の違いによる反応性の変化はみられなかった。

3) 抗 HA 抗体が認識する立体的エピトープ解析のため、Dox 制御性に HA を発現させるシステムを構築した。今回作製したベクターを利用して、H5HA と H1HA 間で主要なドメインを交換したキメラ HA を発現させるベクターを作製

中である。

4) アルカリフォスファターゼ標識抗体の添加濃度増量、トランスファー量増量、装置での測定シーケンスの改善、反応時間の延長 (12 分→15 分) の組合せで感度改善効果が見られ、これらを組合せることで従来キットに比べ 5.4 倍の感度向上を達成した。また、前処理液量を減らすことにより更に 1.8 倍感度が向上したことから、約 10 倍高感度のキットの作製に成功した。この改良型 H5HA キットの特異性や交差反応性においては従来型と同じであることを確認した。

5) 改良型の H5HA キットを用いることにより、NIHE では、これまで検出できなかった臨床検体が 1 例を除く全てで陽性となった(陽性率 90%)。一方、前回同様実施した、イムノクロマト法と H5 LAMP 法では前回と全く同じ結果で、陽性率はより低いものであった。従って、改良型 H5HA 検出キットはこれら 2 つの方法と比較して、はるかに感度良くインフルエンザの H5 型を判定できることが明らかになった。一方 HCM Pasteur ではクレードは 1.1 で NIHE (2.3.4) とは異なった臨床検体を測定した結果、9 例中 7 例は陽性、1 例は偽陽性であった。イムノクロマトでは 1 例のみ、LAMP 法では 5 例のみ陽性であり、ここでも改良型キットの検出率が最も良いことが実証された。

D. 考察

ペプチド抗原に立体構造保持フレームを付与する事により、ペプチドが由来するオリジナルの高分子 (HA 分子) との反応性が増強されることは、これまで報告がなく、新しい発見である。また、これまでに作製した抗体のスクリーニング法として今回見出した SDS 濃度は、ウイルス抗原が適度に変性し、検出抗体が大きく変性することなく機能する条件であると考えられる。これらの結果は、本来免疫原となりにくい標的エピトープに対する新たな型共通および特異的抗体確立のために重要な知見である。

現在、臨床現場で使用可能なインフルエンザ H5N1 の迅速キットは実用化・販売されていない。改良した POCube H5/AB 検出キットは、装置が全自動測定で安全、簡易、迅速 (15 分) であり、かつ高感度に臨床分離検体から H5 型ウイルスを検出できたことから、十分実用化可能な性能を有すると思われる。このキットの開発により、高病原性鳥インフルエンザの発生を流行現場で早期に確認できれば、強毒性インフ

ルエンザのヒト-ヒト流行を低減させることが期待される。更に、あらゆるインフルエンザに対応可能な汎用性の高いインフルエンザウイルス迅速診断システムが開発できれば、我が国の保健医療行政のみならず国際協力にも大きく貢献するであろう。

E. 結論

H5N1 インフルエンザウイルスの H5 に特異的な HA のアミノ酸配列およびエピトープの候補領域から、3 量体を形成した際に HA の表面に出ている事が予測される領域を選択し、この領域部分のペプチドを抗原とするマウスモノクローナル抗体を作製している。また、HA2 領域の α -ヘリックスを含む K38 ペプチドに立体構造保持フレームを付与した P8A-K38 ペプチドは、オリジナルの高分子 (HA 分子) との反応性が增强され、新規の免疫原として有望であることが明らかとなった。一方、これまでにコンピューター予測に基づいて作製した抗ペプチドモノクローナル抗体のウイルス抗原に対する反応性を高めるために、ウイルス抗原を適度に変性させ、かつ検出抗体が大きく変性することなく機能する界面活性剤の濃度条件を見出した。これら新規の抗体の立体的エピトープを確認する一つの手法として、細胞に HA を発現させる系を確立している。

これまでに開発した H5N1 インフルエンザウイルス検出キットは、キット組成・反応条件を改良することで約 10 倍の感度向上を達成した。この改良したキットを用いて、ベトナムとの共同研究で臨床検体を用いた感度評価を行った結果、期待どおりの高率な検出率であることを確認することができた。今後は臨床現場での実用化を目指した製法の検討や改良キットの保存安定性を確認していくと同時に、本研究班で新規に作製されつつあるインフルエンザウイルスに対する型共通および型特異的抗体を用いて、更に汎用性の高い診断キットの確立を目指す。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Terahara, K., Ishige, M., Ikeno, S., Mitsuki, Y-y, Okada, S., Kobayashi, K. and

Tsunetsugu-Yokota, Y.: Expansion of activated memory CD4⁺ T cells affects infectivity of CCR5-tropic HIV-1 in humanized NOD/SCID/JAK3^{null} mice. *PLoS One*, 8:e53495, 2013.

- 2) Tsunetsugu-Yokota, Y. and Terahara, K.: Receptor usage and the pathogenesis in acute and chronic virus infections. *Front. Microbiol.*3:289, 2012.
- 3) Sugimoto, C., Nakamura, S., Hagen, S. I., Tsunetsugu-Yokota, Y., Villinger, F., Ansari, A.A., Suzuki, Y., Yamamoto, N., Nagai, Y., Picker, L.J., Mori, K. : Glycosylation of SIV influences immune-tissue targeting during primary infection that leads to immunodeficiency or viral control *J. Virol.* 86:9323-9336, 2012.
- 4) Nomura, T., Yamamoto, H., Shiino, T., Takahashi, N., Nakane, T., Iwamoto, N., Ishii, H., Tstukamoto, T., Kawada, M., Matsuoka, S., Takeda, A., Terahara, K., Tsunetsugu-Yokota, Y., Iwata-Yoshikawa, N., Hasegawa, H., Sata, T., Naruse, T.K., Kimura, A., Matano, T. : Association of major histocompatibility complex class I haplotypes with disease progression after simian immunodeficiency virus challenge in Burmese rhesus macaques. *J. Virol.* 86:6481-6490, 2012.
- 5) Mitsuki, Y-Y., Terahara, K., Shibusawa, K., Yamamoto, T., Tsuchiya, T., Ishige, M., Kobayashi, K., Morikawa, Y., Nakayama, T., Takeda, M., Yanagi, Y., and Tsunetsugu-Yokota, Y. :HIV-1 infection ex vivo accelerates measles virus infection by upregulating signaling lymphocytic activation molecule (SLAM) in CD4⁺ T cells. *J. Virol.* 86:7227-7234, 2012.
- 6) Takeuchi, K., Nagata, N., Kato, S., Ami, Y., Suzaki, Y., Suzuki, T., Sato, Y., Tsunetsugu-Yokota, Y., Mori, K., Nguyen, V. N., Kimura, H., and Nagata, K.: Wild-type measles virus with the hemagglutinin protein of the Edmonston vaccine strain retains wild-type tropism in macaques. *J. Virol.* 86:3027-3037, 2012.
- 7) Ohnishi, K., Takahashi, Y., Kono, N., Nakajima, N., Mizukoshi, F., Misawa, S., Yamamoto, T., Mitsuki, Y., Fu, S., Hirayama, N., Ohshima, M., Ato, M.,

- Kageyama, T., Odagiri, T., Tashiro, M., Kobayashi, K., Itamura, S., Tsunetsugu-Yokota, Y.: Newly established monoclonal antibodies for immunological detection of H5N1 influenza virus. Japanese Journal of Infectious Diseases 65(1):19-27, 2012.
- 8) Takayama, I., Nakauchi, M., Fujisaki, S., Odagiri, T., Tashiro, M., Kageyama, T.: Rapid detection of the S247N neuraminidase mutation in influenza A(H1N1)pdm09 virus by one-step duplex RT-PCR assay. Journal of Virological Methods 188(1-2):73-75, 2013.
- 9) Takemae, N., Nguyen, T., Ngo, L. T., Hiromoto, Y., Uchida, Y., Pham, V. P., Kageyama, T., Kasuo, S., Shimada, S., Yamashita, Y., Goto, K., Van, H.V.: Hoa, D.T. Hayashi, T., Matsuu, A., Saito, T.: Antigenic variation of H1N1, H1N2 and H3N2 swine influenza viruses in Japan and Vietnam. Archives of Virology. doi:10.1007/s00705-013-1616-8, 2013.
2. 学会発表
- 1) Ikeno, S., Terahara, K., Ishige, M., Suzuki, M., Mitsuki, Y-y, Morikawa, Y., Nakayama, T., Tsunetsugu-Yokota, Y.: Application of humanized mice for the evaluation of measles virus vector. The 11th Awaji International Forum on Infection and Immunity, Awaji, Hyogo, September 11-14, 2012.
- 2) Tsunetsugu-Yokota, Y., Ishige, M. Ikeno, S., and Terahara, K.: Humanized mice as an animal model for human-tropic virus infection, in Immunological Mechanisms of Vaccination, Keystone Symposium, Ottawa, Canada, December 13-18, 2012.
- 3) 池野翔太、寺原和孝、石毛真行、鈴木基臣、光木裕也、森川裕子、中山哲夫、横田恭子。ヒト化マウスの麻疹ウイルスベクター評価系への応用。第60回日本ウイルス学会学術集会、大阪、平成24年11月。
- 4) 岩田奈緒子、永田典代、鈴木忠樹、佐藤由子、横田恭子、西條政幸、森川茂、長谷川秀樹。SARS-CoV 感染動物モデルを用いたUV不活化SARS-CoVの副反応発生機序について。第60回日本ウイルス学会学術集会、大阪、平成24年11月。
- 5) 陳富、船越舟一、孫琳、大西和夫。インフ

ルエンザウイルス・ワクチン特異的なB細胞の検出と評価、第41回日本免疫学会総会、神戸、平成24年12月。

- 6) 影山 努。インフルエンザ診断検査の技術的課題と精度管理について。衛生微生物技術協議会総会第33回研究会。2012年6月
- 7) 大場邦弘、小田智三、高山郁代、中内美名、影山 努。マイクロ流路チップを用いたDirect RT-LAMP法によるインフルエンザ診断の臨床的検討。第61回日本感染症学会東日本地方会学術集会。東京。2012年10月
- 8) 田中智子、大場邦弘、小田智三、高山郁代、中内美名、影山 努。中枢神経症状を呈したA/H3亜型、B型インフルエンザウイルス重複感染の2例。第61回日本感染症学会東日本地方会学術集会。東京。2012年10月
- 9) 高山郁代、中内美名、大場邦弘、田代真人、影山 努。蛍光標識プライマーを用いたDirect RT-LAMP法による季節性インフルエンザウイルスの型・亜型検出系の構築。第60回日本ウイルス学会学術集会。大阪。2012年11月
- 10) 影山 努、高山郁代、中内美名、田代真人、大場邦弘。マイクロ流路チップを用いたDirect RT-LAMP法によるインフルエンザ診断法の開発。第60回日本ウイルス学会学術集会。大阪。2012年11月

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

miRNAを標的とした関節炎治療の開発

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
浅原 弘嗣

研究要旨

RA および OA の発症に関与することが予想される新規 miRNA を複数同定し、その機能解析および miRNA 欠損マウスの作製を行った。

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、山下 聡
- (2) 東京大学 分子細胞生物学研究所
白髭 克彦
- (3) 日本ベ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

関節リウマチ(RA)や変形性関節症(OA)による関節破壊は患部の苦痛に加えて運動に制限を与えることから、患者の QOL を著しく損なう。これら関節炎発症のメカニズムについて、RA においてはT細胞やB細胞をはじめとする獲得免疫系の異常、OA においてはメカニカルストレスが原因の一つとして考えられている。これら2つの異なる疾患の共通の原因として、過度な炎症による関節組織や骨の破壊が挙げられる。

マイクロRNA(miRNA)は長さ20~25塩基からなる non-coding RNA であり、標的遺伝子の発現を翻訳レベルで抑制することにより、様々な疾患の発症に関与することが明らかになっている。これまでに我々は炎症のエフェクター側としてヒト関節リウマチ患者検体由来の膝関節組織において免疫細胞を中心に miR-146a が高発現することを見出した (Nakasa et al. 2008 *Arthritis Rheum*)。関節リウマチをはじめとする組織特異的な自己免疫疾患は従来、IFN γ を産生するヘルパーT細胞であるTh1細胞が病態の発症において主たる原因細胞であると考えられてきた。しかし、近年の研究成果によりインターロイキン-17(IL-17)を産生するヘルパーT細胞群(Th17)が関節リウマチの発症に重要であり、Th1細胞はむしろTh17細胞と拮抗することで抑制的に働くことが明らかになり、Th17の分化・機能制御が関節リウマチの治療戦略において新たな標的となると考えられる。

しかし、我々が見出した miR-146a を含めた miRNA による Th17 細胞の分化制御の分子メカニズムは不明な点が多く、その解明が急務となっている。

一方で我々はヒト OA 検体を用いた解析から miR-140 が軟骨細胞の恒常性の維持を通じて OA の発症を抑制することを明らかにし、炎症のレシーバー側である軟骨組織の維持に miRNA が重要であり、治療標的となりうることを示してきた (Miyaki et al. 2009 *Arthritis Rheum.*, Miyaki et al. 2010 *Genes Dev.*)。

これら miRNA による関節炎発症メカニズムの解明には原因細胞に発現する miRNA の網羅的解析およびその機能解析、標的遺伝子の同定、遺伝子欠損マウスによる生理的意義の評価といった一貫した解析が必要である。また、miRNA は同時に複数の遺伝子とその標的としうることから、バイオインフォマティクスのようなアプローチによる疾患の俯瞰的な解析がより重要となってくる。本研究においてはヒューマンサイエンス財団の枠組みの下に、産学官の連携により RA と OA という質的に異なる関節炎を制御する miRNA を同定し、その生理的意義を分子生物学的、発生工学的およびバイオインフォマティクスの手法を駆使することで明らかにすることを目的とする。

B.研究方法

Th17細胞分化制御 miRNA の機能解析

①Th17特異的な miRNA による分子ネットワークの解析

miRNA と mRNA の発現プロファイルから TargetScan 等、miRNA のターゲット予測データベースの情報を組み合わせることで解析を行い、Th17細胞分化の分子ネットワークを推定した。

②Th17特異的 miRNA の機能解析

候補に挙げられた種々の miRNA についてレンチウイルスベクターを作製し、in vitro における Th17 分化誘導系を用い Th17 細胞分化への関与を検討

するための実験基盤を確立する。

③miRNA 欠損マウスの作製

miRNA の欠損マウスを作製し、in vivo における候補 miRNA の役割を解明を試みた。

OA の病態に関わる miRNA の機能解析

①軟骨細胞で高発現する miRNA の同定

軟骨細胞及び滑膜細胞から RNA を抽出し、miRNA-microarray を行なった。

②間葉系幹細胞の軟骨分化実験

骨髄由来間葉系幹細胞を遠心によりペレット化し、BMP2 および TGFβ3 を添加した chondrogenic medium (Lonza) で 7~21 日間培養し、軟骨分化を行なった。

③軟骨細胞における miR-455 の強制発現

軟骨細胞に miR-455-5p 及び 3p の人工二本鎖 RNA(Ambion)をトランスフェクションし、マイクロアレイ解析を行なった。

miRNA を中心とした分子ネットワークのバイオインフォマティクスの解析

RA および OA の発症にかかわる miRNA の分子制御ネットワークの解析に向けて miRNA の機能解析およびその標的遺伝子の探索を行った。

(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おらず、患者サンプル等を用いたヒト遺伝子解析は行っていない。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、ヒト由来細胞を使用しているが、患者サンプルなどではなく、株化細胞を使用しており、倫理的に問題はない。

今後も必要な場面では、当センターにおいて機関の外部委員を含めた倫理審査委員会により生命倫理、安全管理を厳重に審査し、倫理委員会の承認かつ実施施設の長の許可を得て、全ての研究を遂行する。また、マウス等の動物実験は国立成育医療センターの動物実験委員会の承認を得て遂行する。

C. 研究結果

Th17 細胞分化制御 miRNA の機能解析

脾臓 CD4+ T 細胞を IL-6 および TGF-β1、TGF-β1 存在下に抗 CD3 抗体および抗 CD28 抗体で刺激し Th17、制御性 T 細胞(Treg)を分化誘導し、得られ

た RNA サンプルから miRNA および mRNA のプロファイリングを行った。その結果、分化誘導後 24 時間において Treg に比べ、Th17 で発現が上昇する miRNA が 25 個得られた。その中から最も発現の高かった miR-XX の標的配列を miRNA の標的予測ツール"Target Scan"を用いて標的遺伝子を抽出し、同時に mRNA の発現プロファイルから Th17 の分化に関与することが予測されるシグナル伝達経路として PI3K-Akt 経路を見出した(図 1)。

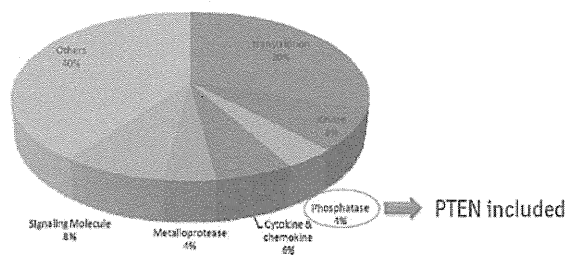


図1 miR-XXの標的遺伝子

miRNA-マイクロアレイにより得られた Th17 分化制御にかかわる miRNA の詳細な解析を行うためにレンチウイルス発現ベクターを作製した。25 個の発現が上昇した miRNA および 8 個の発現が低下した miRNA、これまでの文献報告から Th17 の機能にかかわると予想されるが、機能未知の miRNA を 2 個選定し、それぞれの miRNA を CMV プロモーターで発現制御されるレンチウイルスベクターの IRES-Venus 配列上流にクローニングし、遺伝子導入された細胞を Venus で追跡できるようにした。これらの発現ベクターを用いて作製したレンチウイルスを従来より用いられている方法から最適化し、マウス脾臓より単離した CD4+細胞に効率的に導入する方法を確立した。

また、候補に挙げられた miRNA のノックアウトマウスの作製を試みた。その結果、ノックアウトマウスを複数ライン樹立することに成功し、生殖系列への伝達も確認できた。

OA の病態に関わる miRNA の機能解析

miRNA-マイクロアレイを行なった結果、滑膜細胞に比べ、軟骨細胞での発現が約 30 倍高い miRNA として miR-455 を同定した。本 miRNA は miR-455-5p 及び miR-455-3p 両鎖ともに軟骨細胞において発現が上昇していることを確認した。また、間葉系幹細胞を用いた軟骨分化系を用いて、その発現をリアルタイム PCR により調査した結果、軟骨細胞分化に重要な miRNA である miR-140 と同様に、分化に伴い、miR-455-5p 及び miR-455-3p 両鎖とも発現上昇することが分かった。さらに miR-455-5p 及び miR-455-3p を軟骨細胞にトランスフェクションして過剰発現させ、マ

マイクロアレイ解析を行なった結果、miR-455-5p 及び miR-455-3p により発現が減少する遺伝子として、HIF2 α 、IL-6、PTGS2 を同定した (図 2)。

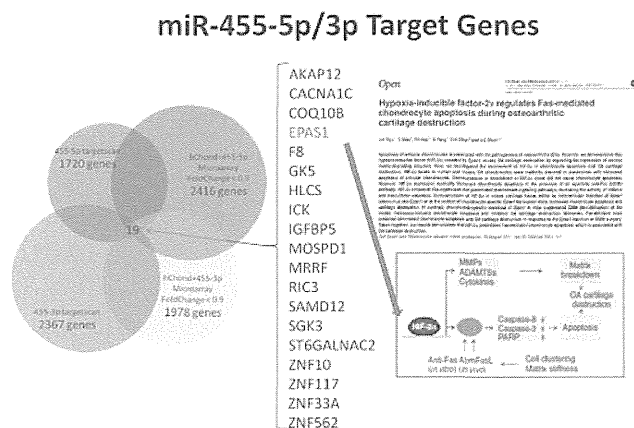


図2 miR-455の標的遺伝子の同定

D.考察

これまでに、mRNA とタンパク質の発現に相関がみられないことが明らかにされており、それらを繋ぐあるいは調整する因子の存在が示唆されていたものの、その本体が何であるかについては明らかにされていなかった。近年、遺伝子の発現を転写後レベルで負に制御、すなわち mRNA の分解や翻訳の阻害で調節する因子として小さな non-coding RNA である miRNA が同定され、様々な研究により、この miRNA は癌、炎症性疾患をはじめ、様々な疾患に関わることが示されてきている。miRNA は一つで多くの遺伝子をターゲットにしていると考えられており、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。しかしながら RA の発症に重要であると考えられている Th17 細胞分化に関わる miRNA はこれまでほとんど明らかにされていない。これらのことから *in vitro* で Th17 細胞分化系を用いてマイクロアレイ解析により網羅的に発現が変動する miRNA と mRNA を探索した。

miRNA および mRNA のプロファイリングより PI3K-Akt 経路の抑制因子である PTEN が miR-XX の標的として重要であることが示された。PI3K-Akt 経路の活性化は Th17 細胞の分化亢進に重要であることが報告されている (Kurebayashi et al. 2012 *Cell Reports*)。これらの報告および本研究で明らかになった miR-XX が PTEN の発現抑制することによる PI3K-Akt 経路の活性化が Th17 の分化制御に重要であることが強く示唆される。これらをより詳細に検討するためには *in vitro* における検討が必要であるが、CD4⁺ T 細胞への遺伝子導入は非常に困難である。そこでレンチウイルスを用いることで高効率に導入でき、また本研究においてその条件を最適化することで、より効率的かつ再現性の良い手法を確立した。今後さらに詳

細を検討するために本研究で構築した発現ベクターや miRNA 欠損マウスを用いた研究により分子機構が明らかになることが期待される。

一方で OA の発症において軟骨細胞の恒常性の維持に miR-140 が重要であることを明らかにしてきた (Miyaki et al 2010 *Genes Dev*)。本研究において新たに、軟骨細胞に高発現する miRNA として miR-455 を同定した。miR-455 は、miR-455-5p 及び miR-455-3p 両鎖ともに軟骨細胞で発現が高く、また軟骨分化により発現が上昇することがわかり、この miRNA が正常軟骨分化のマーカーとなり、軟骨分化に重要な機能を有する可能性が示された。また、miR-455-5p、-3p それぞれの過剰発現により、HIF2 α 、IL-6 及び PTGS2 の発現低下が見られた。これらの遺伝子は炎症に関わる遺伝子であり、miR-455 は、抗炎症作用を持ち、軟骨細胞の保護に関与する可能性が考えられた。

今後は Th17 分化制御における miR-XX の機能を *in vitro* および *in vivo* の解析から明らかにすること、および OA における miR-455 の意義を miR-455 欠損マウスを作製し明らかにしていくことが重要であると考えられる。さらに、得られた実験データよりバイオインフォマティクスの手法を用いることで RA および OA の疾患発症ネットワークを明らかにすることで両疾患の質的な違いが明らかになることが期待される。

E.結論

H24 年度の研究により RA および OA の発症に関与することが予想される新規 miRNA を複数同定し、その機能解析および miRNA 欠損マウスの作製を行った。

F.健康危険情報

なし。

G.研究発表

1. 論文発表

- Miyaki S, Asahara H. Macro view of microRNA function in osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol*. 2012; 8(9): 543-552.
- Watanabe T, Oyama T, Asada M, Harada D, Ito Y, Inagawa M, Suzuki Y, Sugano S, Katube K, Karsenty G, Komori T, Kiatagawa M, Asahara H. MAML1 enhances the transcriptional activity of Runx2 and plays a role in bone development. *PLoS Genet*. 2013; 9(1): e1003132.

2. 学会発表

- Asahara H. The roles of miRNAs in cartilage development and homeostasis. The 22nd CDB Meeting on RNA Sciences in Cell and Developmental Biology II; Session 1 [Small RNA I]; S1-2, Kobe, Hyogo, Japan. June 11-13, 2012.

2. Asahara H. The role of Sox9 for miR-140 expression in cartilage development and arthritis. 4th International Conference on Osteoimmunology: Interactions of the Immune and Skeletal Systems; Posters 81, Dassia, Corfu, Greece. June 17-22, 2012.

3. 佐藤天平, 味八木茂, 浅原弘嗣. mir-140/-マウスの軟骨特異的な表現型レスキュー実験. 第14回日本RNA学会年会(14th RNA meeting in Tohoku); ポスターセッション(1); P-6, 宮城. 7月18-20日, 2012.

4. 浅原弘嗣. Macro view of micro RNA functions in cartilage development and osteoarthritis pathogenesis. 第9回 Bone Biology Forum; セッション IX, Lecture VI, 静岡. 8月24-25日, 2012.

5. 浅原弘嗣. The roles of miRNAs in cartilage development and homeostasis. 第4回日本RNAi研究会(The 22nd HCS/ 4th JARI Joint Symposium) “MacroRNAs in Cancer” ; Symposium 4, 広島. 8月30日-9月1日, 2012.

6. Asahara H. Cartilage, Tendon, Muscle tissue development and homeostasis. 13th Annual Meeting for the Korean Society of Osteoporosis; Symposium Mesenchymal Stem Cells and Tissue Repairs; Carilage, Tendon, Muscle; JSO, Seoul, Korea. October 21. 2012.

7. Ayabe F, Miyaki S, Brinson D, Yamashita S, Nakahara H, Otabe K, Duffy S, Grogan S, Takada S, Lotz MK, Asahara H. Role of mirorna-455 networks in mesenchymal cell differentiation and osteoarthritis. 2012 ACR/ARHP Annual Meeting; ACR Poster Session A; 28, Washington D.C., USA. November 11-14, 2012.

8. 浅原弘嗣. システムアプローチによる炎症を制御する miRNA ネットワークの解析. 第35回日本分子生物学会年会; 2W11II-8, 福岡. 12月10-14日, 2012.

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

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

国立感染症研究所ウイルス第1部
井上直樹

平成22年4月～平成25年3月

研究要旨 1) ヒト胎盤片移植 SCID-hu、マウス胎盤直接感染、妊娠モルモットなど、先天性 CMV 感染の防御・治療法開発に必須な動物モデルやモルモット胎盤組織培養系を確立した。2) 胎盤感染や神経学的後遺症発生の機序を明らかにした。3) gB ワクチンは胎盤への感染を抑制するが、胎盤内や胎盤から胎児への伝播を防御できないことを明らかにした。

研究分担者

- (1) 国立感染症研究所感染病理部 片野 晴隆
 - (2) 浜松医科大学医学部 小杉伊三夫
 - (3) 東海大学医学部 竹腰 正隆
- 外国側研究者(研究委託)
- (4) カリフォルニア大学サンフランシスコ校
Lenore Pereira

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、健常人に疾病を起こさない。しかし、妊婦の感染は胎盤を経て胎児に感染し、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こす。我々は、先天性 CMV 感染が新生児 300 人当り 1 人に見られ、その 2 割以上に臨床症状を発生させることを、これまでに示してきた(Ogawa 他'07;Koyano 他'09,'11)。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、再感染や再活性化によっても起こるが、初感染の場合が重症であり、中和抗体により相当程度感染を制御できることが疫学的に知られる。CMV がコードする糖蛋白 B(gB) は、中和抗体の主要標的のひとつである。gB サブユニットワクチンの臨床試験が最近行われ約 50%の感染防御効果があったが、実用化には程遠い。感染妊婦へのグロブリン製剤投与に一定の効果が報告されているが、全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適用は制限される。

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果たすが、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による感染防御・治療法を開発することが求められる。

本研究は、感染防御・治療法の前臨床試験に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。さらに、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した。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 マウス感染モデル(Pereira)、マウス胎盤内感染モデル(小杉)、妊娠モルモット感染モデルとその胎盤組織培養系(井上, 片野)、ヒト CMV(HCMV) に対する中和抗体の開発(竹腰)を、それぞれ分担した。

B. 研究方法

1. HCMV 感染胎盤及び臍帯血の解析(Pereira)

Cedar-Sinai Medical Center で出産した原因不明の胎内発達遅滞(IUGR) 7 例、妊娠高血圧腎症 3 例、及び何らの病状も無い対照 9 例の妊婦から得られた母体血及び臍帯血や胎盤の生検を解析した。CMV に対する IgG avidity (Radim)、中和抗体価、HCMV 蛋白に対するイムノブロット(Mikrogen)のプロファイルを解析するとともに、胎盤中のウイルス DNA の検出や病理解析を行った。sFlt1 定量にはサンドイッチ ELISA (Quanti kine, R&D Systems)を、cmvIL-10 レベルの測定には、以前に報告した抗原捕捉 ELISA を用いた。

2. HCMV 感染胎盤組織の解析(小杉)

CMV 感染胎盤及び対照として双胎羊膜構造の確認目的に供された非感染後期胎盤を解析した。