

顧みられない寄生虫病の 効果的監視法の確立と 感染機構の解明に関する研究

研究代表者
国立感染症研究所 野崎智義

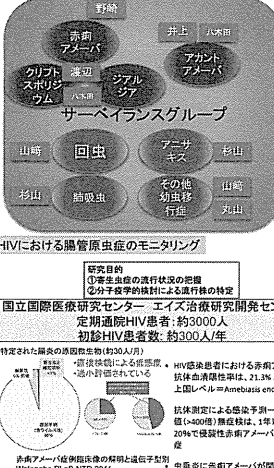
研究の必要性・背景

- ・ 顧みられないが、我が国で問題となりうる寄生虫症の発生・まん延を防止するため、起因生物の生物学的特質・感染機構の理解、検査・診断・監視体制の確立、予防・治療法の開発が不可欠
- ・ 同時に、新興寄生虫症の出現に即座に対応出来るように、寄生虫症研究基盤の底上げ、研究者相互連携とネットワークの強化が必要

研究組織 (4グループ 14名)



具体的成果 (サーベイランスグループ)



アカントアメーバ角膜炎の疫学研究・診断系の確立 井上・八木田
・疫学データの蓄積
・臨床株の集積
・薬剤感受性試験の確立
・治療法の開発

PhotoDynamicTherapy (PDT) によるアノキサシンの効果的治療
Citicによる殺菌作用の抑制効果の検証

ジアルジア症迅速診断法による効果的監視に関する研究 八木田
DFA顕微鏡法(臨床検体用)
ELISAアッセイ法
免疫クロマトキット開発
国産検体の標準化、キットの粗製供給

研究成果 (診断法・型別開発グループ)

幼虫移行症の血清診断キット開発と分子病理診断法の確立
ヒト血清中のIgM/IgG抗体の検出
プラジルトキソカラ症患者血清で評価

マンソン原虫でもキットが成立した病原機構
有棘顎口虫 診断抗原スクリーニング
患者血清を用いた2次スクリーニングにより73-6cDNAを選択
MMP(matrix metalloproteinase)

幼虫移行症の病原機構
プ・イス回虫による幼虫移行症の個別診断を開発

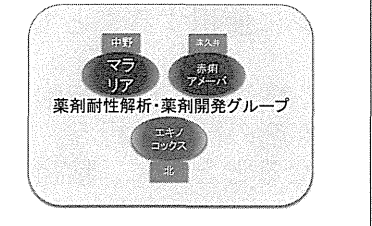
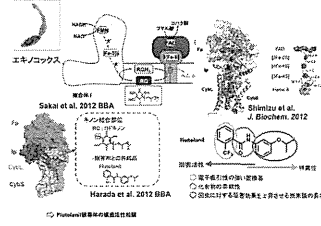
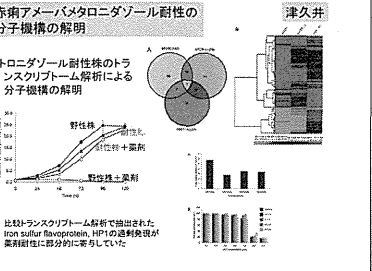
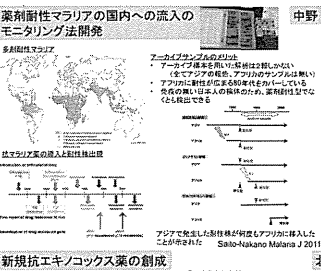
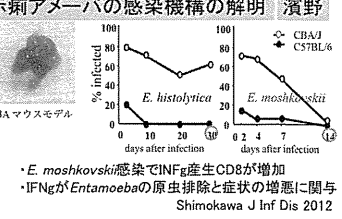
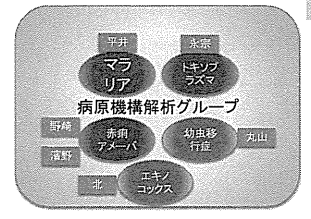
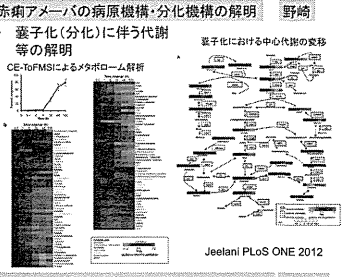
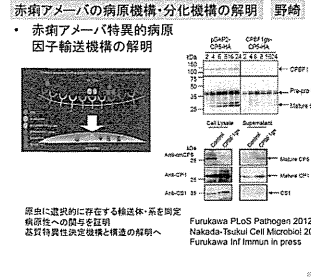
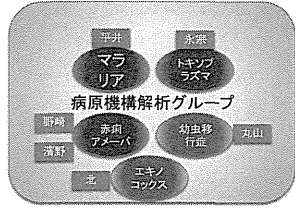
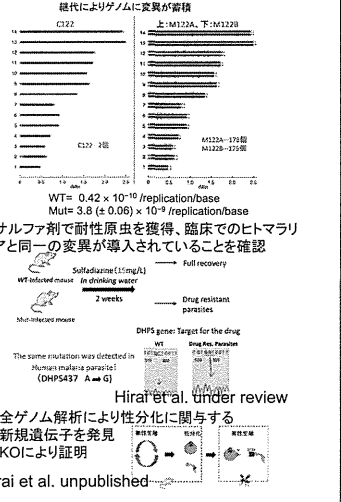
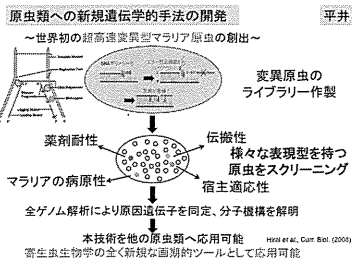
幼虫移行症の分子機構の解明
ベネズエラ原虫

丸山

研究成果 (診断法・型別開発グループ)

住血吸虫症の人獣モニタリング法の開発 河津
東・東南アジアでの住血吸虫感染に、動物・環境をも含めたUniversalな診断法確立とフィールド試験が必要

肺吸虫鑑別法/アニサキス血清診断法の確立 杉山
ヒト・中間宿主の両方で利用可能な診断法の選定とフィールド試験を完了



期待される行政施策への貢献

- 顧みられない原虫・寄生虫の
- 発生動向の把握
 - 検査・診断の標準化
 - 検査診断キットの開発・普及・供給体制の構築
 - 感染・寄生機構に関する幅広い知的基盤の整備と新興再興への準備
 - 小規模な研究グループ間のネットワークの形成

平成 24 年度 新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業 『成果概要』

研究課題：経鼻インフルエンザワクチン等粘膜ワクチンの有効性に関する研究

課題番号：H23-新興-一般-015

予定期間：H23 年度から H25 年度まで

研究代表者：長谷川秀樹

所属研究機関：国立感染症研究所

所属部局：感染病理部

職名：部長

年次別研究費(交付決定額)：1年目 26,400,000 円 2年目 26,400,000 円

I. 研究の意義

- (1) 新型インフルエンザにも対応可能なより予防効果の高い経鼻粘膜投与型ワクチンを実用化するための、ワクチンの有効性を高める基盤的研究とヒトでの有効性を評価する方法の確立を目的とする。
- (2) ワクチン製造の元となるシードウイルス株の性質は、ワクチンの製造効率や効果に大きな影響を与える。そのためワクチン候補株の増殖効率、遺伝的安定性、抗原的安定性等を解析することは、株を選択する上で非常に重要である。
- (3) 粘膜ワクチンの有効性に重要な自然免疫応答の制御機構は未解明な点が多い。本研究では脂質代謝系を介した自然免疫応答制御を解明することにより、粘膜ワクチンの有効性を高める創薬基盤を確立する。

II. 研究の目的、期待される成果

- (1) 新型インフルエンザ、季節性インフルエンザ両方に対して効果的な防御方法としての経鼻粘膜投与型ワクチンの臨床応用の為の有効性の確立が期待される。
- (2) ワクチンシードとして優れたウイルス株を検討・選択することにより増殖効率が高く遺伝的・抗原的安定性にも優れたウイルス株を粘膜ワクチンに使用することで、より短期間に効果の高いワクチンを製造することが可能となる。
- (3) リン脂質分解酵素 PAFAH2 の自然免疫応答における機能を、培養細胞およびノックアウトマウスを用いて明らかにする。また PAFAH2 の特異的阻害剤の探索を行う。本研究により、脂質代謝系を介した自然免疫賦活化の分子基盤が明らかとなるとともに、粘膜ワクチンの有効性を高める全く新しいアジュバンドの創製が期待される。

III. 2年間の研究成果

・研究代表者（長谷川秀樹）

- (1) 経鼻インフルエンザワクチンの有効性を調べるため成人ボランティアに季節性インフルエンザウイルスの三倍濃縮スプリットワクチンを経鼻接種し誘導する免疫について、血清中和抗体、鼻腔洗浄液を採取し中和抗体及び HI 抗体価の測定方法の標準化を行った。
- (2) 従来、鼻腔洗浄液での中和抗体、HI 抗体価の測定は困難であったが、濾過法と濃縮方法を工夫する事により血清と対比させて鼻腔洗浄液の中和抗体、HI 抗体を測定する事が可能になった。本方法は今後粘膜ワクチンの評価の為に必須の手法となる事が期待される。
- (3) 本測定法を用いる事により 3 倍濃縮スプリットワクチンの成人への経鼻接種により、ウイルス株特異的な中和抗体を鼻腔洗浄液及び血清で誘導される事が判った。また中和反応を担う抗体のサブタイプは鼻腔洗浄液及び血清の分画により鼻腔洗浄液では IgA 抗体血中では IgG 抗体である事が明らかとなった。更に個体のこれまでのウイルス抗原への感作履歴を反映し、異なるウイルス株に対しても中和活性を示すことが明らかになった。ワクチン経鼻接種後の中和抗体価は鼻腔洗浄液では血清に先行して有意に上昇する事が明らかとなった。
- (4) 成人ボランティア 50 名に季節性インフルエンザウイルス (A/Victoria/210/2009 (H3N2)) の三倍濃縮全粒子不活化ワクチンを 3 週間間隔で計 2 回経鼻接種し継時的に採血と鼻腔洗浄液の回収を行い、ワクチン株に対する中和抗体価及び HI 価を測定し評価した。(国立感染症研究ヒトを対象とする医学研究倫理審査委員会の承認済み。) 血清の HI 価において現行の有効性基準

を満たす応答がみられ更に鼻腔洗浄液中に中和抗体価の上昇が認められた。

- (5) 更に高病原性鳥インフルエンザウイルス H5N1 に対する全粒子不活化ワクチンの臨床研究も進行中である。

・研究分担者（奥野良信）

- (1) AH5 型インフルエンザワクチンを抗原とした経鼻投与製剤を作製し、カニクイザルを用いて有効な免疫応答とパンデミック期間をカバーする持続性を確認した。
- (2) 2012-2013 シーズン用季節性インフルエンザウイルスから免疫応答評価用のワクチン原液を作製した。
- (3) (2) で作製したワクチン原液の品質管理試験及び安定性試験を行い、抗体価調査用として使用できることを確認した。
- (4) (2) で作製したワクチン原液からヒトへの投与を想定した経鼻投与用試作ワクチン製剤を作製し、GLP 試験（ラットを用いた毒性・生殖発生試験、及びサルを用いた安全性薬理試験）を開始した。

・研究分担者（田代真人）

- (1) 研究代表が行う臨床研究において、抗体産生細胞に関する解析を担当し、高病原性鳥インフルエンザウイルス（H5N1）全粒子不活化ワクチンの経鼻接種を行うと回数依存的に末梢血中の抗体産生形質細胞数が増加し IgA 抗体産生形質細胞は、IgG 抗体産生形質細胞の約二倍誘導されることが明らかとなった。
- (2) 経鼻ワクチンによる抗体の多様性を解析した。CDR3 の長さは、IgG 抗体と比べて IgA 抗体の方で幅があることが明らかになり経鼻ワクチンでは IgG 抗体よりも多様性に富んだ IgA 抗体が誘導され可能性が示唆された。

・研究分担者（新井洋由）

- (1) PAFAH2 はマウスの鼻腔上皮に比較的高く発現していることが明らかとなった。またインフルエンザウイルス感染に伴い PAFAH2 ノックアウトマウスではインターフェロン応答に関わる遺伝子（IFNA4、IFNB、ISG54）の発現誘導が野生型マウスに比べ有意に増強していた。
- (2) PAFAH2 ノックアウトマウスでは野生型マウスに比べて、インフルエンザ感染による HA に対する抗体（IgG）の産生量が有意に増加していた。
- (3) PAFAH2 は RIG-I like pathway を負に制御する因子であることを明らかにした。

IV. 平成 25 年度の課題

- (1) 被接種者が無垢な抗原での経鼻ワクチンの有効性について高病原性鳥インフルエンザウイルス H5N1 に対するワクチンの有効性の検討が必要である。
- (2) 経鼻投与用試作ワクチン製剤の GLP 試験を継続・完了させる。
- (3) 作製した試作ワクチンを用い、動物を用いて効果を裏付ける試験を実施する。
- (4) GLP 試験・効果を裏付ける試験の成績から実用性・改良点に関する検討を行う。
- (5) 自然免疫腑活化における PAFAH2 の作用の分子メカニズムを解明するために、培養細胞を用いた解析を行う。また PAFAH2 ノックアウトマウスを Balb/c と戻し交配し、インフルエンザウイルス感染時の IgA 抗体応答に対する PAFAH2 の関与を調べる。

V. 行政施策への貢献の可能性

- (1) 新規ワクチンである経鼻インフルエンザワクチンの実用化時に必要になる有効性の指標の為の科学的根拠を示す事ができる。
- (2) 粘膜ワクチンに応用可能な優れたワクチンシードを選択することにより、実用化された際には速やかに効果の高いワクチンを供給することが可能になる。これによって、国が進める新型インフルエンザ対策に大きく貢献できると考えられる。
- (3) 有効性の高いワクチン開発の基盤的研究となる。安全かつ有効なワクチンの供給が可能となる。
- (4) 注射型以外にワクチンの選択肢が広がることにより、注射に抵抗感のある人でもワクチンの接種を受けることが可能となる。

VI. 本研究の成果(発表論文・ガイドライン・マニュアル等)

研究代表者 長谷川秀樹

- (1) Nakajima N, Van Tin N, Sato Y, Thach HN, Katano H, Diep PH, Kumasaka T, Thuy NT, Hasegawa H, San LT, Kawachi S, Liem NT, Suzuki K, Sata T. Pathological study of archival lung tissues from five fatal cases of avian H5N1 influenza in Vietnam. *Mod Pathol.* 2012 Nov 23. doi: 10.1038/modpathol.2012.193. [Epub ahead of print]
- (2) Sasaki I, Hoshino K, Sugiyama T, Yamazaki C, Yano T, Iizuka A, Hemmi H, Tanaka T, Saito M, Sugiyama M, Fukuda Y, Ohta T, Sato K, Ainai A, Suzuki T, Hasegawa H, Toyama-Sorimachi N, Kohara H, Nagasawa T, Kaisho T. Spi-B is critical for plasmacytoid dendritic cell function and development. *Blood.* 2012 Oct 11. [Epub ahead of print]
- (3) van Riet E, Ainai A, Suzuki T, Hasegawa H. Mucosal IgA responses in influenza virus infections: thoughts for vaccine design. *Vaccine.* 2012 Aug 31;30(40):5893-900. Epub 2012 Jul 24.
- (4) Yanagita H, Yamamoto N, Fuji H, Liu X, Ogata M, Yokota M, Takaku H, Hasegawa H, Odagiri T, Tashiro M, Hoshino T. Mechanism of drug resistance of hemagglutinin of influenza virus and potent scaffolds inhibiting its function. *ACS Chem Biol.* 2012 Mar 16;7(3):552-62. Epub 2012 Jan 13.
- (5) Ainai A, Tamura S, Suzuki T, Ito R, Asanuma H, Tanimoto T, Gomi Y, Manabe S, Ishikawa T, Okuno Y, Odagiri T, Tashiro M, Sata T, Kurata T, Hasegawa H. Characterization of Neutralizing Antibodies in Adults After Intranasal Vaccination With an Inactivated Influenza Vaccine. *J Med Virol* 2012 Feb;84(2):336-44.
- (6) Suzuki T, Ainai A, Nagata N, Sata T, Sawa H, Hasegawa H. A novel function of the N-terminal domain of PA in assembly of influenza A virus RNA polymerase. *Biochem Biophys Res Commun.* 2011 Nov 4;414(4):719-26. Epub 2011 Oct 6.
- (7) Nakajima N, Sato Y, Katano H, Hasegawa H, Kumasaka T, Hata S, Tanaka S, Amano T, Kasai T, Chong JM, Iiduka T, Nakazato I, Hino Y, Hamamatsu A, Horiguchi H, Tanaka T, Hasagawa A, Kanaya Y, Oku R, Oya T, Sata T. Histopathological and immunohistochemical findings of 20 autopsy cases with 2009 H1N1 virus infection. *Mod Pathol.* 2011 Aug 26. doi: 10.1038/modpathol.2011.125. [Epub ahead of print]

特許権等知的財産権の取得及び申請状況

- (1) 発明の名称：粘膜免疫誘導アジュバントを含む新規ワクチン
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：長谷川秀樹、倉田 毅、佐多徹太郎、森山雅美、田村慎一、谷本武史
特許第 4817625 号（登録日 平成 23 年 9 月 9 日）
- (2) 発明の名称：経鼻ワクチン
特許権者：独立行政法人理化学研究所、国立感染症研究所長
発明者：清野研一郎、谷口克、田代卓哉、富宿賢一、森謙治、長谷川秀樹
特許第 4909264 号（登録日 平成 24 年 1 月 20 日）

研究分担者 奥野良信

- (1) Ainai A, Tamura S, Suzuki T, Ito R, Asanuma H, Tanimoto T, Gomi Y, Manabe S, Ishikawa T, Okuno Y, Odagiri T, Tashiro M, Sata T, Kurata T, Hasegawa H. Characterization of neutralizing antibodies in adults after intranasal vaccination with an inactivated influenza vaccine. *J Med Virol.* 2012;84(2):336-44.

研究分担者 田代真人

- (1) Suzuki T, Ainai A, Nagata N, Sata T, Sawa H, Hasegawa H. A novel function of the N-terminal domain of PA in assembly of influenza A virus RNA polymerase. *Biochem Biophys Res Commun.* 2011 Nov 4;414(4):719-26.
- (2) Harada Y, Ninomiya-Mori A, Takahashi Y, Shirakura M, Kishida N, Kageyama T, Tada Y, Tashiro M, Odagiri T. Inactivated and adjuvanted whole-virion clade 2.3.4 H5N1 pre-pandemic influenza vaccine possesses broad protective efficacy against infection by heterologous clades of highly pathogenic H5N1 avian influenza virus in mice. *Vaccine.* 2011 Oct 26;29(46):8330-7
- (3) Ichinohe T, Ainai A, Nakamura T, Akiyama Y, Maeyama JI, Odagiri T, Tashiro M, Takahashi H, Sawa H, Tamura SI, Chiba J, Kurata T, Sata T, Hasegawa H. Induction of cross-protective immunity against influenza A virus H5N1 by an intranasal vaccine with extracts of mushroom mycelia. *J Med Virol.* 2010 Jan;82(1):128-37.
- (4) Ainai A, Ichinohe T, Tamura S, Kurata T, Sata T, Tashiro M and Hasegawa H: Zymosan enhances the mucosal adjuvant activity of Poly(I:C) in a nasal influenza vaccine *J Med Virol.* *J Med Virol.* 2010 Mar;82(3):476-84.

- (5) Ikeno D, Kimachi K, Kudo Y, Goto S, Itamura S, Odagiri T, Tashiro M, Kino Y. A prime-boost vaccination of mice with heterologous H5N1 strains. *Vaccine* 2009, 27:3121-5.
- (6) Takahashi Y, Hasegawa H, Hara Y, Ato M, Ninomiya A, Takagi H, Odagiri T, Sata T, Tashiro M, Kobayashi K: Protective immunity afforded by inactivated H5N1 (NIBRG-14) vaccine requires antibodies against both hemagglutinin and neuraminidase in mice. *J Infect Dis.* 2009, 199(11):1629-37.
- (7) Ichinohe T, Ainai A, Nakamura T, Akiyama Y, Maeyama JI, Odagiri T, Tashiro M, Takahashi H, Sawa H, Tamura SI, Chiba J, Kurata T, Sata T, Hasegawa H. Induction of cross-protective immunity against influenza A virus H5N1 by an intranasal vaccine with extracts of mushroom mycelia. *J Med Virol.* 2010 Jan;82(1):128-37.
- (8) Ichinohe T, Ainai A, Tashiro M, Sata T, Hasegawa H. PolyI:polyC12U adjuvant-combined intranasal vaccine protects mice against highly pathogenic H5N1 influenza virus variants. *Vaccine.* 2009 Oct 23;27(45):6276-9.

研究分担者 新井 洋由

- (1) Lee HC, Inoue T, Sasaki J, Kubo T, Matsuda S, Nakasaki Y, Hattori M, Tanaka F, Udagawa O, Kono N, Itoh T, Ogiso H, Taguchi R, Arita M, Sasaki T, Arai H. LPIAT1 regulates arachidonic acid content in phosphatidylinositol and is required for cortical lamination in mice. *Mol Biol Cell*, in press
- (2) Lee HC, Kubo T, Kono N, Kage-Nakadai E, Gengyo-Ando K, Mitani S, Inoue T, Arai H. Depletion of mboa-7, an enzyme that incorporates polyunsaturated fatty acids into phosphatidylinositol (PI), impairs PI 3-phosphate signaling in *Caenorhabditis elegans*. *Genes Cells.* 17:748-57 (2012).
- (3) Lee S, Uchida Y, Emoto K, Umeda M, Kuge O, Taguchi T, Arai H. Impaired retrograde membrane traffic through endosomes in a mutant CHO cell defective in phosphatidylserine synthesis. *Genes Cells.* 17:728-36 (2012).
- (4) Yachi R, Uchida Y, Balakrishna BH, Anderlueh G, Kobayashi T, Taguchi T, Arai H. Subcellular localization of sphingomyelin revealed by two toxin-based probes in mammalian cells. *Genes Cells.* 17:720-7 (2012).
- (5) Shichiri M, Kono N, Shimanaka Y, Tanito M, Rotzoll DE, Yoshida Y, Hagihara Y, Tamai H, Arai H. A novel role for α -tocopherol transfer protein (α -TTP) in protecting against chloroquine toxicity. *J Biol Chem.* 287:2926-34 (2012).

VII. III (2年間の研究成果)の概要図等

目的

- ・ 経鼻投与インフルエンザワクチンのヒトでの有効性の評価法の確立
- ・ 同ワクチンの有効性を高める

方法

- ・ ヒトでの臨床研究による有効性の検討
- ・ ヒトでの試験の為動物モデルでの非 GLP 下での安全性検討とデータの蓄積
- ・ 動物での有効性データの蓄積
- ・ 経鼻ワクチンの有効な株の選択
- ・ 脂質代謝系を介した自然免疫賦活化の分子基盤が明らかにし新しいアジュバントの創製を目指す。

得られた成果

- ・ 従来、困難であった鼻腔洗浄液中での中和抗体、HI 抗体価の測定法を確立した。
- ・ ワクチンの経鼻接種時に誘導される免疫について、血清中和抗体、鼻腔洗浄液中の中和抗体及び HI 抗体価の測定方法の標準化を行った。
- ・ 中和反応を担う抗体のサブタイプは分画により鼻腔洗浄液では IgA 抗体血中では IgG 抗体であることが明らかとなった。
- ・ 全粒子不活化インフルエンザワクチンの経鼻接種で HI の現行評価基準を満たすことを示した。
- ・ A/H1N1 及び A/H5N1 において経鼻ワクチン株の選定及び増殖性の検討を行った。
- ・ インフルエンザウイルス感染時の抗体応答に脂質代謝系の PAFAH2 が関与していることが明らかとなった。更に PAFAH2 は RIG-I like pathway を負に制御する因子で有ることが明らかとなった。

●研究代表者の研究歴等

▪ 過去に所属した研究機関の履歴

北海道大学

国立予防衛生研究所

ロックフェラー大学 (米国)

ユニバーシティ・カレッジ・ダブリン (アイルランド)

国立感染症研究所

▪ 主な共同研究者(又は指導を受けた研究者)

• William W Hall (University College Dublin)

• 長嶋和郎 (北海道大学)

• 倉田毅 (国立感染症研究所)

• 澤洋文 (北海道大学)

▪ 主な研究課題

• HTLV-1 の感染機構の解明

• 成人 T 細胞性白血病 (ATL) 発症メカニズムの解明とモデル動物の作成

• 粘膜免疫を活用したワクチンの開発

• インフルエンザの病態解明と経鼻ワクチンの開発

▪ これまでの研究実績

1. Nakajima N, Van Tin N, Sato Y, Thach HN, Katano H, Diep PH, Kumasaka T, Thuy NT, Hasegawa H, San LT, Kawachi S, Liem NT, Suzuki K, Sata T. Pathological study of archival lung tissues from five fatal cases of avian H5N1 influenza in Vietnam. *Mod Pathol.* 2012 Nov 23. doi: 10.1038/modpathol.2012.193. [Epub ahead of print]
2. 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.* 2012 Nov 7. [Epub ahead of print]
3. 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.* 2012;5(8):814-23. Epub 2012 Oct 1.
4. Sasaki I, Hoshino K, Sugiyama T, Yamazaki C, Yano T, Iizuka A, Hemmi H, Tanaka T, Saito M, Sugiyama M, Fukuda Y, Ohta T, Sato K, Aina A, Suzuki T, Hasegawa H, Toyama-Sorimachi N, Kohara H, Nagasawa T, Kaisho T. Spi-B is critical for plasmacytoid dendritic cell function and development. *Blood.* 2012 Oct 11. [Epub ahead of print]
5. Inoue N, Matsushita M, Fukui Y, Yamada S, Tsuda M, Higashi C, Kaneko K, Hasegawa H, Yamaguchi T. Identification of a varicella-zoster virus replication inhibitor that blocks capsid assembly by interacting with the floor domain of the major capsid protein. *J Virol.* 2012 Nov;86(22):12198-207. doi: 10.1128/JVI.01280-12. Epub 2012 Aug 29.
6. van Riet E, Aina A, Suzuki T, Hasegawa H. Mucosal IgA responses in influenza virus infections; thoughts for vaccine design. *Vaccine.* 2012 Aug 31;30(40):5893-900. Epub 2012 Jul 24.

7. Nomura T, Yamamoto H, Shiino T, Takahashi N, Nakane T, Iwamoto N, Ishii H, Tsukamoto T, Kawada M, Matsuoka S, Takeda A, Terahara K, Tsunetsugu-Yokota Y, Iwata-Yoshikawa N, Hasegawa H, Sata T, Naruse TK, 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.* 2012 Jun;86(12):6481-90. Epub 2012 Apr 4.
8. Tanaka M, Kato A, Satoh Y, Ide T, Sagou K, Kimura K, Hasegawa H, Kawaguchi Y. Herpes simplex virus 1 VP22 regulates translocation of multiple viral and cellular proteins and promotes neurovirulence. *J Virol.* 2012 May;86(9):5264-77. doi: 10.1128/JVI.06913-11. Epub 2012 Feb 22.
9. **Yanagita H, Yamamoto N, Fuji H, Liu X, Ogata M, Yokota M, Takaku H, Hasegawa H, Odagiri T, Tashiro M, Hoshino T. Mechanism of drug resistance of hemagglutinin of influenza virus and potent scaffolds inhibiting its function. *ACS Chem Biol.* 2012 Mar 16;7(3):552-62. Epub 2012 Jan 13.**
10. **Ainai A, Tamura S, Suzuki T, Ito R, Asanuma H, Tanimoto T, Gomi Y, Manabe S, Ishikawa T, Okuno Y, Odagiri T, Tashiro M, Sata T, Kurata T, Hasegawa H. Characterization of Neutralizing Antibodies in Adults After Intranasal Vaccination With an Inactivated Influenza Vaccine. *J Med Virol* 2012 Feb;84(2):336-44.**
11. **Suzuki T, Ainai A, Nagata N, Sata T, Sawa H, Hasegawa H. A novel function of the N-terminal domain of PA in assembly of influenza A virus RNA polymerase. *Biochem Biophys Res Commun.* 2011 Nov 4;414(4):719-26.**
12. **Nakajima N, Sato Y, Katano H, Hasegawa H, Kumasaka T, Hata S, Tanaka S, Amano T, Kasai T, Chong JM, Iiduka T, Nakazato I, Hino Y, Hamamatsu A, Horiguchi H, Tanaka T, Hasegawa A, Kanaya Y, Oku R, Oya T, Sata T. Histopathological and immunohistochemical findings of 20 autopsy cases with 2009 H1N1 virus infection. *Mod Pathol.* 2011 Aug 26. doi: 10.1038/modpathol.2011.125. [Epub ahead of print]**
13. Ainai A, Tashiro M, Hasegawa H. Cross-protective immunity against influenza virus infections induced by intranasal vaccination together with a TLR3-mucosal adjuvant. *Hum Vaccin.* 2011 Jan 1;7:174-82.
14. Hajj E H., El-Sabban M, Hasegawa H, Zaatari G, Ablain J, Saab T. S, Janin A, Mahfouz R, Nasr R, Kfoury Y, Nicot C, Hermine O, Hall WW, de The H, Bazarbachi A. Therapy-induced selective loss of leukemia-initiating cell activity in murine ATL. *J Exp Med.* 2010 Dec 20;207(13):2785-92.
15. Ichinohe T, Ainai A, Ami Y, Nagata N, Iwata N, Kawaguchi A, Suzuki Y, Odagiri T, Tashiro M, Takahashi H, Strayer D, Carter W, Chiba J, Tamura S, Sata T, Kurata T, Hasegawa H. Intranasal administration of adjuvant-combined vaccine protects monkeys from challenge with the highly pathogenic influenza A H5N1 virus. *J Med Virol.* 2010 Oct;82(10):1754-61
16. Watters KM, Dean J, Hasegawa H, Sawa H, Hall W, Sheehy N. Cytokine and growth factor expression by HTLV-1 Lck-tax transgenic cells in SCID mice. *AIDS Res Human Retrovir.* 2010 May;26(5):593-603
17. Ainai A, Ichinohe T, Tamura S, Kurata T, Sata T, Tashiro M, Hasegawa H. Zymosan enhances the mucosal adjuvant activity of Poly(I:C) in a nasal influenza vaccine. *J Med Virol.* 2010 Mar;82(3):476-84
18. Ichinohe T, Ainai A, Nakamura T, Akiyama Y, Maeyama J, Odagiri T, Tashiro M, Takahashi H, Sawa H, Tamura S, Chiba J, Kurata T, Sata T, Hasegawa H. Induction of cross-protective immunity against influenza A virus H5N1 by intranasal vaccine with extracts of mushroom mycelia. *J Med Virol.* 82:128-137, 2010
19. Kawaguchi A, Orba Y, Kimura T, Iha H, Ogata M, Tsuji T, Ainai A, Sata T, Okamoto T, Hall W.W, Sawa H, Hasegawa H. Inhibition of the SDF-1 α -CXCR4 axis by the CXCR4 antagonist AMD3100 suppresses the migration of cultured cells from ATL patients and murine lymphoblastoid cells from HTLV-I Tax transgenic mice. *Blood* 2009 Oct 1;114(14):2961-8. Epub 2009 Aug 5

20. Yamazaki J, Mizukami T, Takizawa K, Kuramitsu M, Momose H, Masumi A, Ami Y, Hasegawa H, Hall W. W, Tsujimoto H, Hamaguchi I, Yamaguchi K. Identification of Cancer Stem Cells in a Tax-transgenic (Tax-Tg) Mouse Model of Adult T-Cell Leukemia/lymphoma (ATL). *Blood* 2009 Sep 24;114(13):2709-20. Epub 2009 Jul 7
21. Ichinohe T, Ainai A, Tashiro M, Sata T, Hasegawa H. PolyI:polyC12U adjuvant-combined intranasal vaccine protects mice against highly pathogenic H5N1 influenza virus variants. *Vaccine* 2009 Oct 23;27(45):6276-9
22. Hasegawa H, Ichinohe T, Ainai A, Tamura S, Kurata T. Development of an inactivated mucosal vaccine for H5N1 influenza virus. *Ther Clin Risk Manag.* 2009 Feb;5(1):125-32
23. Kamijuku H, Nagata Y, Jiang X, Ichinohe T, Tashiro T, Mori K, Taniguchi M, Hase K, Ohno H, Shimaoka T, Yonehara S, Odagiri T, Tashiro M, Sata T, Hasegawa H*, Seino KI. Mechanism of NKT cell activation by intranasal coadministration of α -galactosylceramide, which can induce cross-protection against influenza viruses *Mucosal Immunol.* 2008 May;1(3):208-18. Epub 2008 Mar 5.
24. Ichinohe T, Tamura S, Kawaguchi A, Ninomiya A, Imai M, Itamura S, Odagiri T, Tashiro M, Takahashi H, Sawa H, Mitchell WM, Strayer DR, Carter WA, Chiba J, Kurata T, Sata T, Hasegawa H*. Cross-protection against H5N1 influenza virus infection afforded by intranasal administration of seasonal trivalent inactivated influenza vaccine. *J Infect Dis.* 2007 Nov 1;196(9):1313-20. Epub 2007 Oct 5.
25. Ichinohe T, Kawaguchi A, Tamura S, Ninomiya A, Imai M, Itamura S, Odagiri T, Tashiro M, Chiba J, Sata T, Kurata T and Hasegawa H* Intranasal immunization with H5N1 vaccine plus Poly I:Poly C12U, a Toll-like receptor agonist, protects mice against homologous and heterologous virus challenge. *Microbes and Infection* 2007 Sep;9(11):1333-40. 2007 Jul 1; [Epub ahead of print]
26. Ichinohe T, Nagata N, Strong P, Tamura SI, Takahashi H, Ninomiya A, Imai M, Odagiri T, Tashiro M, Sawa H, Chiba J, Kurata T, Sata T, Hasegawa H*. Prophylactic effects of chitin microparticles (CMP) on highly pathogenic H5N1 influenza virus. *J Med Virol.* 2007 Jun;79(6):811-819
27. Hasegawa H*, Ichinohe T, Tamura S, Kurata T Development of a mucosal vaccine for influenza viruses: preparation for a potential influenza pandemic. *Expert Review of Vaccines*, April 2007, Vol. 6, No. 2, Pages 193-201.
28. Ichinohe T, Ito S, Kawaguchi A, Tamura S, Takahashi H, Sawa H, Moriyama M, Chiba J, Kurata T, Sata T, and Hasegawa H* Protection against influenza virus infection by intranasal vaccine with Surfclam Powder as a mucosal adjuvant. *J Med Virol*, 2006 78:954-963.
29. Hasegawa H, Sawa H, Lewis M, Orba Y, Sheehy N, Yamamoto Y, Ichinohe T, Tsunetsugu-Yokota Y, Katano H, Takahashi H, Matsuda J, Sata T, Kurata T, Nagashima K, Hall WW. Development of Thymus-Derived T-cell Leukemia/Lymphoma in Mice Transgenic for the Tax gene of Human T-Lymphotropic Virus Type-I (HTLV-I). *Nature Medicine* 2006 Apr;12(4):466-472.
30. Ichinohe T, Watanabe I, Ito S, Fujii H, Moriyama M, Tamura S, Takahashi H, Sawa H, Chiba J, Kurata T, Sata T, and Hasegawa H*, Synthetic double-stranded RNA [poly (I:C)] combined with mucosal vaccine protects against influenza virus infection. *Journal of Virology*, 2005 Mar;79(5):2910-9.
31. Hasegawa H, Ichinohe T, Strong P, Watanabe I, Ito S, Tamura S, Takahashi H, Sawa H, Chiba J, Kurata T, Sata T. Protection against influenza virus infection by intranasal administration of HA vaccine with chitin microparticles as an adjuvant. *Journal of Medical Virology*, 2005 Jan; 75:130-136.
32. Hasegawa H, Katano H, Tanno M, Masuo S, Ae T, Sato Y, Takahashi H, Iwasaki T, Kurata T, Sata T. BCL-6-positive Human Herpesvirus 8-associated Solid Lymphoma Arising from Liver and Spleen as Multiple Nodular Lesions. *Leuk Lymphoma.* 2004 Oct;45(10):2169-72.
33. Watanabe I, Ross TM, Tamura S, Ichinohe T, Ito S, Takahashi H, SawaH, Chiba J, Kurata T, SataT, HasegawaH* Protection against influenza virus infection by intranasal administration of C3d-fused

- hemagglutinin. *Vaccine* 2003 Nov 7;21(31):4532-8.
34. Dewan MZ, Terashima K, Taruishi M, Hasegawa H, Ito M, Tanaka Y, Mori N, Sata T, Koyanagi Y, Maeda M, Kubuki Y, Okayama A, Fujii M, Yamamoto N. Rapid tumor formation of human T-cell leukemia virus type 1-infected cell lines in novel NOD-SCID/gammac(null) mice: suppression by an inhibitor against NF-kappaB. *J Virol.* 2003 May;77(9):5286-94.
 35. Hasegawa H, Tatsumi M, Ogawa-Goto K, Takahashi H, Iwasaki T, Kurata T, Sata T, Takeuchi T, Sheehy N, Sawa H, Nagashima K and Hall WW. Processing of the HTLV-II envelope precursor glycoprotein, gp63 by furin is essential for cell fusion activity. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2002, 18: 1253-1260.
 36. Hasegawa H*, Kadowaki S, Aizawa H, Takahashi H, Iwasaki T, Tamura S, Kurata T, Sata T. Persistent influenza virus infection of irradiated mice and its prevention by intranasal vaccination. *Vaccine* 2002, 20: 1050-1057.
 37. Hasegawa H*, Kadowaki S, Takahashi H, Iwasaki T, Tamura S, Kurata T. Protection against influenza virus infection by nasal vaccination in advance of sublethal irradiation. *Vaccine.* 2000, 22: 2560-2565.
 38. Egan JF, O'Leary B, Lewis MJ, Mulcahy F, Sheehy N, Hasegawa H, Fitzpatrick F, O'Connor JJ, O'Riordan J, Hall WW, High rate of human T lymphotropic virus type IIa infection in HIV type 1-infected intravenous drug abusers in Ireland. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 1999, 15: 699-705.
 39. Takai S, Hasegawa H, Kiyokawa E, Yamada K, Kurata T, Matsuda M.: Chromosomal Mapping of the Gene Encoding DOCK180, a Major-Crk-Binding Protein, to 10q26.13-q26.3 by Fluorescence in Situ Hybridization. *Genomics* 1996, 35: 403-404.
 40. Hasegawa H., Kiyokawa E, Tanaka S, Nagashima K, Gotoh N, Shibuya M, Kurata T, Matsuda M: DOCK180, a Major CRK-Binding Protein, Alters Cell Morphology upon Translocation to the Membrane. *Mol Cell Biol*,1996, 16: 1770-1776.
 41. Matsuda M, Hashimoto Y, Muroya K, Hasegawa H, Kurata T, Tanaka S, Nakamura S, Hattori S. CRK protein binds to two guanine nucleotide-releasing proteins for the Ras family and modulates nerve growth factor-induced activation of Ras in PC12 cells. *Mol Cell Biol.* 1994, 14: 5495-5500.

・特許権等知的財産権の取得及び申請状況

(1) 発明の名称：粘膜免疫誘導アジュバントを含む新規ワクチン

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：長谷川秀樹、倉田 毅、佐多徹太郎、森山雅美、田村慎一、谷本武史

特許第 4817625 号（登録日 平成 23 年 9 月 9 日）

(2) 発明の名称：経鼻ワクチン

特許権者：独立行政法人理化学研究所、国立感染症研究所長

発明者：清野研一郎、谷口克、田代卓哉、富宿賢一、森謙治、長谷川秀樹

特許第 4909264 号（登録日 平成 24 年 1 月 20 日）

経鼻インフルエンザワクチン等粘膜ワクチンの有効性に関する研究

研究代表者: 長谷川 秀樹・国立感染症研究所感染病理部
分担研究者:

田代 真人・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
奥野 良信・財団法人阪大微生物研究会
新井 洋由・東京大学大学院薬学系研究科

背景と目的

動物モデルを用いた実験において

- 経鼻インフルエンザワクチンにより誘導される免疫は、
1. 上気道にてウイルスの感染を阻止する。(分泌型IgA抗体)
 2. ウイルス性肺炎を阻止する。(IgG抗体)
 3. 変異ウイルスに対する交叉防御。(分泌型IgA抗体)

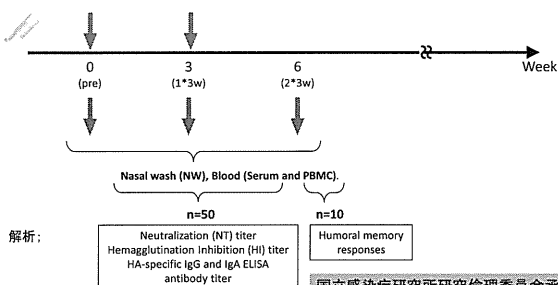
では、ヒトではどうなのか？

鼻腔の粘液中の抗体はインフルエンザウイルスを中和できるのか？
鼻腔中の抗体の構造と機能は？

ヒトの鼻腔洗浄液中の機能的な抗体の解析をする事で、
経鼻インフルエンザワクチンの有効性を評価する。

ワクチン接種スケジュール

ワクチン: 全粒子不活化インフルエンザワクチン
A/Victoria/210/2009 (H3N2) [2010/11シーズン] (45 µg HA/dose)
500 µl 噴霧 (片鼻250 µl 噴霧)



結語

1. 経鼻ワクチンの効果評価に血清に加え鼻腔洗浄液が有用でありその標準化方法を確立した。
2. 経鼻噴霧型インフルエンザワクチン接種は、ヒトにおいても現行の評価基準を満たす可能性を示した。
3. 中和活性を示す抗体は、血中ではIgG抗体であり、鼻腔洗浄液中ではIgA抗体であることを改めて示した。
4. 経鼻不活化全粒子ワクチンを3週間隔で2回投与する事によりヒトで血清中及び鼻洗浄液に、HI・中和抗体応答を誘導した。

課題

1. 鼻腔洗浄液中の中和抗体価と実際の感染防御の相関を示す必要がある。
2. ナイーブな個体での粘膜免疫誘導についての検討が必要。
3. ワクチン量の低減の必要性。

平成24年度 新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業 『成果概要』

研究課題： HTLV-1 感染症の診断法の標準化と発症リスクの解明に関する研究
 課題番号： H23-新興-一般-016
 予定期間： H23年度からH25年度まで
 研究代表者： 浜口 功
 所属研究機関： 国立感染症研究所
 所属部局： 血液・安全性研究部
 職名： 部長
 年次別研究費(交付決定額)：1年目 31,870,000 円 2年目 27,270,000 円

I. 研究の意義

- (1) HTLV-1 検査法の標準化により、妊婦スクリーニングをはじめ HTLV-1 感染の総合的な対策に役立つ。
- (2) HTLV-1 ウイルス量測定法の標準化をはかり、世界に先駆けて標準的 HTLV-1 診断法を確立できる。
- (3) キャリアの発生の実態を解析するとともに、無症候性キャリアのリスク増悪に関連する因子を明らかにし、総合的フォロー対策に役立つ。

II. 研究の目的、期待される成果

- (1) PCR による HTLV-1 核酸検査を新たに標準化し、確認検査が正確かつ迅速に行われることを目指す。
- (2) HTLV-1 関連疾患の発症危険因子とされる HTLV-1 ウイルス量を正確に測定できることにより、予後の予測が可能となる。
- (3) HTLV-1 ウイルス量測定を指標に、リスク増悪に関連する因子を、JSPFAD (Joint Study for Predisposing Factor of ATL Development) を活用した疫学的解析により明らかにする。

III. 2年間の研究成果**・研究代表者 浜口功**

標準品候補品の選定と作製：各施設での測定値のばらつきをなくし、正確な値を得るためにも非常に重要である。核酸コピー数測定を行う際の尺度となるもの(標準品)の設定について検討した。ウイルスコピー数の測定値の安定性、ばらつき等を検討した結果、HTLV-1 感染細胞株(TL-0m1)をPBMCで希釈した候補品を選定し作製した。

標準品に用いる細胞株(TL-0m1)の性状解析：本標準品を国際標準品として設定することを目指して細胞株の性状を詳細に解析した。TL-0m1の染色体は4倍体であった。また、TL-0m1のプロウイルスはFISH解析によりすべて1p13に1細胞あたり平均1.8コピーの割合で組み込まれ、全長が8942塩基であり各施設のプライマーとプローブ配列は一致することを確認した。これらの結果から、TL-0m1がHTLV-1コピー数測定の際の標準品として有用である事を示せた。(論文準備中)

参照品の作製：今後各施設で毎回の試験に供するための参照品が必要となる。標準品のコピー数に基づいて値付けした参照品の作製することを決定した。平成24年度中に作製を開始する。参照品の準備により、本試験法がさらに普及することが期待される。

本試験法の判定保留例に対する有効性の検討：献血血液のスクリーニングにおいて判定保留であった97検体について本核酸検査を行ったところ、48検体(49.5%)で核酸検査陽性の結果を得、検査の有用性が示された。この結果から、判定保留例に対して本核酸検査法が有効であることが明らかとなった。

共同研究の統括：浜口班の8施設で標準品およびHTLV-1陽性臨床検体の共同測定を実施し、データの集約および解析を行った。標準品測定結果から算出した各施設の補正係数で臨床検体の測定結果を補正したところ、測定値の一致度が上昇し、核酸検査法の標準化は可能であるとの結果を得た。厚生労働省科学研究板橋班と協力して進めている、妊婦における判定保留例の解析を浜口班での共同測定により明らかにする準備を始めた。

・研究分担者(大隈和、山口一成、渡邊俊樹、岡山昭彦、佐竹正博、出雲周二、山野嘉久、上平憲、齋藤滋)

核酸検査法の確立：平成24年度までに浜口班で作製した標準品を用いる測定技術を各施設において確立した。各施設の測定の格差は3倍以下となり、正確なコピー数測定が可能となった。

核酸検査法の検出限界の解析：妊婦におけるHTLV-1スクリーニングで判定保留となった検体に対応する能力が求められるため、本核酸検査法の検出限界について検討した。一度の検査に供する検体量を増やすことにより検出感度の向上が予想される。そこで各施設で測定可能な最大検体量を検討したところ、1マイクログラムであった。この検体量でウイルスコピー数を測定したところ、感度が従来の10倍となり、細胞10万個に4個感染細胞が存在するとHTLV-1感染を検出できることが判明した。核酸検査の感度としては十分であると考えられる。

対外診断薬の開発支援：早期の保険適用を目指すために、協力研究者である協和メデックスとキアゲンジャパンは本研究班の標準化された測定方法を採用した新規のHTLV-1核酸検査に関する体外診断薬開発に着手した。研究班は迅速な開発が遂行できるよう、研究結果を開示し開発の支援を行う。

・研究分担者(望月学、高起良、内丸薫、魚住公治、緒方正男、相良康子、宇都宮與、岩永正子)

キャリアの予後予測因子、血漿HGF測定とデータ解析：平成23年度に全国の協力医療機関から提供されたJSPFADマテリアルバンクの血液試料を用いて、血漿HGF(肝細胞成長因子)が無症候性キャリアで有意に高値である事が示唆された。平成24年に日本赤十字社の献血血液80検体を用いた解析では十分な有意性が確認できなかった。今後も継続してバイオマーカー候補の検索を行っていく。

水平感染によるキャリアの発生の実態調査の検討と実施：HTLV-1感染においては母乳による感染が最も主要な感染経路とされるが、水平感染の実態は明らかにされていない。平成24年度より、2005～2006年に九州地区で初回献血を行った15万件のHTLV-1抗体陰性のドナーをスタディーにエントリーし、2011年末までの間にHTLV-1に感染したかを日本赤十字社の保有するスーパーコンピューターを用いて解析する。設定した期間に複数回献血を行ったドナーについて、陽転化例を抽出することにより、HTLV-1水平感染の実態を解析する。今後、全国規模での解析を行うための基礎データを得る。

・研究分担者(巽正志、大隈和)

早期の保険適用を目指した先進医療によるHTLV-1検査法の実施：早期の保険適用を目指し、本検査法を大学病院検査科で実施することを推進する。これまでに熊本大学と交渉を進めており、本研究班で標準化されたHTLV-1核酸検査法の技術移転を開始した。医療施設での実用化をさらに進める。

妊婦のスクリーニング検査の問題点の整理：板橋班と共同で妊婦スクリーニングサンプルで判定保留検体約 50 検体の収集が進んでいる。平成 25 年度には、妊婦スクリーニングサンプルで陽性検体の 100 検体を目処に収集を予定している。これらの検体から核酸および血漿を分離し、既存の検査法（抗体検査、ウェスタンブロット法）及び本核酸検査法を同時に実施し、測定結果を比較検討する。

IV. 平成 25 年度の課題

(1) 標準化された HTLV-1 検査法の普及と保険適用：標準化された核酸検査の早期の保険適用を目指し、先進医療による検査実施の拡大と体外診断薬開発への支援を行う。

(2) 妊婦スクリーニングにおいて陽性および判定保留となったサンプルの解析：妊婦検体から核酸および血漿を分離し、既存の検査法（抗体検査、ウェスタンブロット法）及び本核酸検査法を同時に実施し、測定結果を比較検討する。これらの結果より妊婦検診におけるスクリーニング検査の問題点の整理と改善を図る。

(3) キャリアの発生・発症リスクの解明：2005～2006 年に九州地区で初回献血を行った 15 万件の HTLV-1 抗体陰性のドナーをスタディーにエントリーし、2011 年末までの間に HTLV-1 に感染したかを解析する。今後、全国規模での解析を行うための基礎データを得る。

V. 行政施策への貢献の可能性

PCR 法による妊婦スクリーニング検体測定システムの構築：妊婦に対する HTLV-1 抗体検査が公費助成されるとともに、産婦人科診療ガイドラインで推奨レベル A（強く推奨する）に変更になった。今後本核酸検査法を導入することにより、年間数 100 例（推定）の判定保留例への対応が可能となる。

VI. 本研究の成果（発表論文・ガイドライン・マニュアル等）

(1) 研究代表者 浜口功

1. Odaka C, Kato H, Otsubo H, Takamoto S, Okada Y, Taneichi M, Okuma K, Sagawa K, Hoshi Y, Tasaki T, Fujii Y, Yonemura Y, Iwao N, Tanaka A, Okazaki H, Momose S, Kitazawa J, Mori H, Matsushita A, Nomura H, Yasoshima H, Ohkusa Y, Yamaguchi K, Hamaguchi I: Online reporting system for transfusion-related adverse events to enhance recipient haemovigilance in Japan: a pilot study. *Transfus Apher Sci*. 2012, in press.

(2) 分担研究者

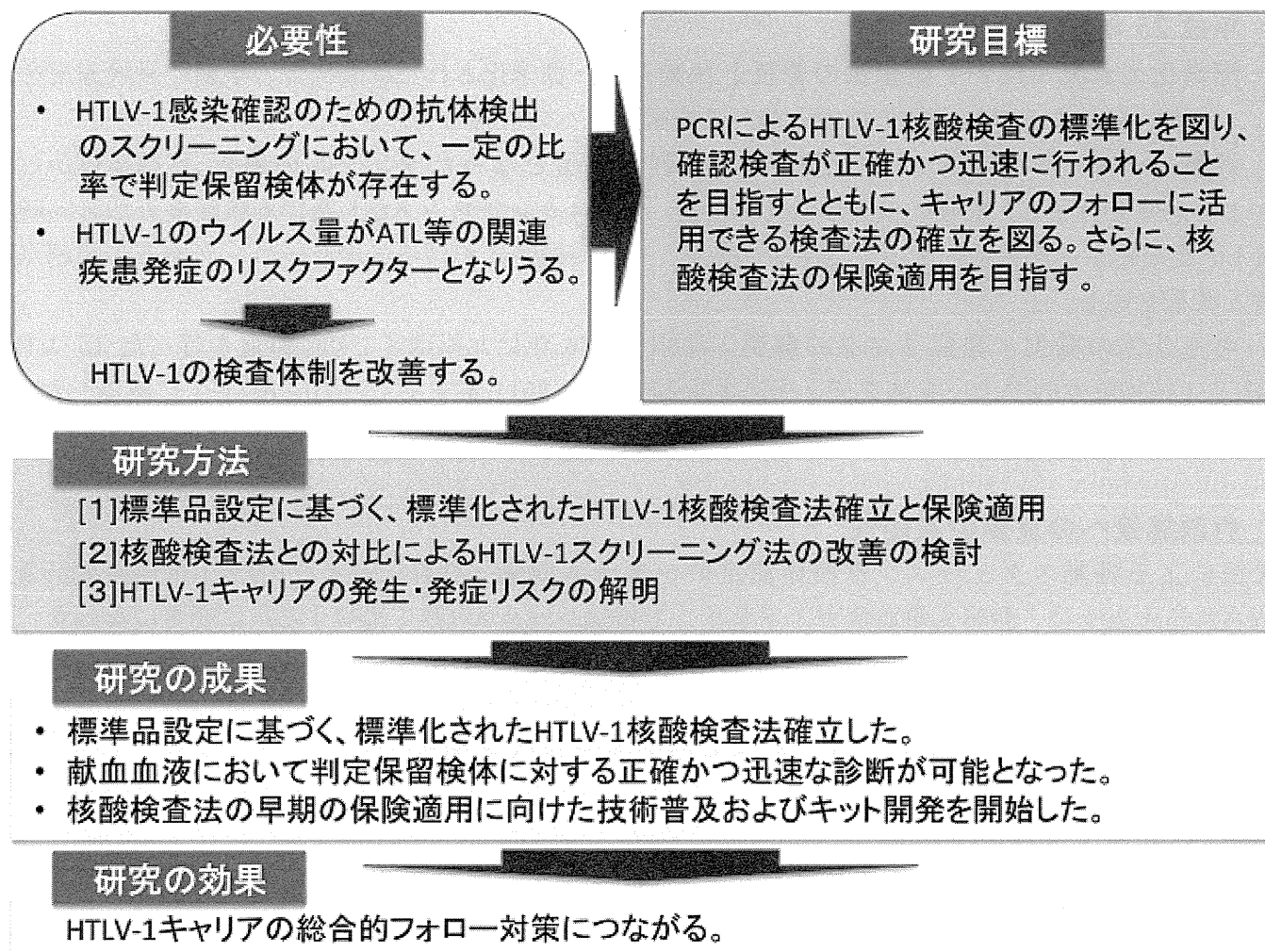
2. Iwanaga M, Watanabe T, Yamaguchi K.: Adult T-cell leukemia: a review of epidemiological evidence. *Frontiers in Virology* 2012 in press.

3. Yamagishi M, Nakano K, Miyake A, Yamochi T, Kagami Y, Tsutsumi A, Matsuda Y, Sato-Otsubo A, Muto S, Utsunomiya A, Yamaguchi K, Uchimaru K, Ogawa S, Watanabe T: Polycomb-mediated loss of miR-31 activates NIK-dependent NF- κ B pathway in adult T-cell leukemia and other cancers. *Cancer Cell* 21(1): 121-135, 2012

4. Satake M, Yamaguchi K, Tadokoro K.: Current prevalence of HTLV-1 in Japan as determined by screening of blood donors. *J Med Virol* 84(2):327-35, 2012

5. Ueno S, Umeki K, Takajo I, Nagatomo Y, Kusumoto N, Umekita K, Morishita K, Okayama A. Proviral loads of human T-lymphotropic virus type 1 in asymptomatic carriers with different infection routes. *Int J Cancer* 130(10):2318-2326, 2012

Ⅶ. Ⅲ (2年間の研究成果)の概要図等



●研究代表者の研究歴等

・過去に所属した研究機関の履歴

1989年4月-1993年3月 熊本大学第二内科（高月清教授）のもとで、HTLV-1の基礎及び臨床研究を行う。1993年4月-1997年3月 熊本大学大学院医学研究科博士課程（須田年生教授）、造血幹細胞に特異的に発現する分子の機能解析、1997年4月-1998年3月 学術振興会・特別研究員（熊本大学医学部分化制御部門、須田年生教授）マウスにおける造血発生のメカニズム解析、1998年4月-2002年8月 スウェーデン、ルンド大学医学部遺伝子治療部門・客員研究員（ステファン=カールソン教授）造血幹細胞を用いた遺伝子治療法の開発、2002年9月-2004年7月 慶応義塾大学医学部発生分化生物学講座・講師（須田年生教授）ES細胞からの造血発生のメカニズム解析、2004年8月-現在 国立感染症研究所・血液安全性研究部（山口一成部長）血液製剤の安全性評価および血液製剤を介する感染症に関する研究、2009年4月より血液・安全性研究部長として、血液の安全性に関連する研究を推進している。

・主な共同研究者(又は指導を受けた研究者)

高月清（元熊本大学教授）、須田年生（慶応義塾大学教授）、ステファン=カールソン（ルンド大学教授）、山口一成（元国立感染症研究所部長）

・主な研究課題

- 血液を介する感染症に対する検査法開発
- 生物学的製剤（血液製剤、ワクチン）の安全性
- HTLV-1感染によるリンパ腫発生のメカニズムと予防
- C型肝炎ウイルス感染によるリンパ腫発生のメカニズムと予防

・これまでの研究実績

1. *Odaka C, Kato H, Otsubo H, Takamoto S, Okada Y, Taneichi M, Okuma K, Sagawa K, Hoshi Y, Tasaki T, Fujii Y, Yonemura Y, Iwao N, Tanaka A, Okazaki H, Momose S, Kitazawa J, Mori H, Matsushita A, Nomura H, Yasoshima H, Ohkusa Y, Yamaguchi K, Hamaguchi I*: Online reporting system for transfusion-related adverse events to enhance recipient haemovigilance in Japan: a pilot study. Transfus Apher Sci. 2012, in press. (*corresponding author)*
2. Kuramitsu M, Sato-Otsubo A, Morio T, Takagi M, Toki T, Terui K, RuNan Wang, Kanno H, Ohga S, Ohara A, Kojima S, Kito T, Goi K, Kudo K, Matsubayashi T, Mizue N, Ozeki M, Masumi A, Momose H, Takizawa K, Mizukami T, Yamaguchi K, Ogawa S, Ito E, Hamaguchi I*. Extensive gene deletions in Japanese patients with Diamond-Blackfan anemia. *Blood* 2012;119(10):2376-84 (*corresponding author)
3. Tsuruno C, Okuma K, Takahashi Y, Tanaka R, Tanaka Y, Takahama Y, Hamaguchi Y, Hamaguchi I, Yamaguchi K. A recombinant vesicular stomatitis virus encoding HIV-1 receptors and human OX40 ligand efficiently eliminates HIV-1-infected CD4-positive T cells expressing OX40. *Hum Immunol.* 2011; 72: 295-304.
4. Ochiai M, Yamamoto A, Naito S, Maeyama J, Masumi A, Hamaguchi I, Horiuchi Y, Yamaguchi K. Applicability of bacterial endotoxins test to various blood products by the use of endotoxin-specific lysates. *Biologicals.* 2010; 38: 629-636.

5. Momose H*, Imai J*, Hamaguchi I*, Kawamura M, Mizukami T, Naito S, Masumi A, Maeyama J, Takizawa K, Kuramitsu M, Nomura N, Watanabe S, Yamaguchi K. Induction of indistinguishable gene expression patterns in rats by Vero cell-derived and mouse brain-derived Japanese encephalitis vaccines. *Jpn J Infect Dis.* 2010; 63: 25-30. (*equally first)
6. Mizuochi T, Ito M, Saito K, Kasai M, Kunimura T, Morohoshi T, Momose H, Hamaguchi I, Takai K, Iino S, Suzuki M, Mochida S, Ikebuchi K, Yamaguchi K. Possible recruitment of peripheral blood CXCR3+ CD27+ CD19+ B cells to the liver of chronic hepatitis C patients. *J Interferon Cytokine Res.* 2010; 30: 243-252.
7. Yamazaki J, Mizukami T, Takizawa K, Kuramitsu M, Momose H, Masumi A, Ami Y, Hasegawa H, Hall WW, Tsujimoto H, Hamaguchi I*, Yamaguchi K. Identification of cancer stem cells in a Tax-transgenic (Tax-Tg) mouse model of adult T- cell leukemia / lymphoma (ATL). *Blood.* 2009 Sep 24;114(13):2709-20. (*corresponding author)
8. Masumi A*, Hamaguchi I*, Kuramitsu M, Mizukami T, Takizawa K, Momose H, Naito S, Yamaguchi K. Interferon Regulatory factor-2 induces megakaryopoiesis in mouse bone marrow hematopoietic cells. *FEBS Lett.* 2009 Nov 3;583(21):3493-500. (*equally corresponding author)
9. Ohmura M, Naka K, Hoshii T, Muraguchi T, Shugo H, Tamase A, Uema N, Ooshio T, Arai F, Takubo K, Nagamatsu G, Hamaguchi I, Takagi M, Ishihara M, Sakurada K, Miyaji H, Suda T, Hirao A. Identification of stem cells during prepubertal spermatogenesis via monitoring of nucleostemin promoter activity. *Stem Cells.* 2008 Dec;26(12):3237-46.
10. Mizukami T, Masumi A, Momose H, Kuramitsu M, Takizawa K, Naito S, Maeyama J-I, Furuhashi K, Tsuruhara M, Hamaguchi I*, Yamaguchi K, An improved abnormal toxicity test by using reference vaccine-specific body weight curves and histopathological data for monitoring vaccine quality and safety in Japan. *Biologicals*, 37, 8-17, 2009 (* corresponding author)
11. Ohmura M, Naka K, Hoshii T, Muraguchi T, Shugo H, Tamase A, Uema N, Ooshio T, Arai F, Takubo K, Nagamatsu G, Hamaguchi I, Takagi M, Ishihara M, Sakurada K, Miyaji H, Suda T, Hirao A, Identification of stem cells during prepubertal spermatogenesis via monitoring of nucleostemin promoter activity. *Stem Cells*, 26, 3237-3246, 2008
12. Hamaguchi I, Imai J-I, Momose H, Kawamura M, Mizukami T, Naito S, Maeyama J-I, Masumi A, Kuramitsu M, Takizawa K, Kato H, Mizutani T, Horiuchi Y, Nomura N, Watanabe S, Yamaguchi K, Application of quantitative gene expression analysis for pertussis vaccine safety control. *Vaccine*, 26 :4686-96, 2008
13. Mizukami T*, Imai J-I*, Hamaguchi I*, Kawamura M, Momose H, Naito S, Maeyama J-I, Masumi A, Kuramitsu M, Takizawa K, Nomura N, Watanabe S, Yamaguchi K, Application of complementary DNA microarray technology to influenza A/Vietnam/1194/2004 (H5N1) vaccine safety evaluation. *Vaccine*, 26 :2270-83, 2008 (*equally first)
14. Miyake K, Utsugisawa T, Flygare J, Kiefer T, Hamaguchi I, Richiter J, Karlsson S. RPS19 deficiency leads to reduced proliferation and increased apoptosis but does not affect terminal erythroid differentiation in a cell line model of Diamond-Blackfan anemia. *Stem Cells*, 26: 323-329, 2008.
15. Kuramitsu M, Hamaguchi I*, Mizukami T, Masumi A, Momose H, Takizawa K, Mochizuki M, Naito S, Yamaguchi K. Deficient RPS19 protein production induces cell cycle arrest in erythroid progenitor cells. *Brit. J.*

- Haematol.*, 140: 348-359, 2008. (* corresponding author)
16. Mizukami T, Kuramitsu M, Takizawa K, Momose H, Masumi A, Naito S, Iwama A, Ogawa T, Noce T, Hamaguchi I*, and Yamaguchi K. Identification of transcripts commonly expressed in both hematopoietic and germline stem cells. *Stem Cell & Dev.*, 17: 67-80, 2008. (* corresponding author)
 17. Naito S, Maeyama J, Mizukami T, Takahashi M, Hamaguchi I, Yamaguchi K. Transcutaneous immunization by merely prolonging the duration of antigen presence on the skin of mice induces a potent antigen-specific antibody response even in the absence of an adjuvant. *Vaccine*, 25: 8762-8770, 2007
 18. Hamaguchi I, Imai J-I, Momose H, Kawamura M, Mizukami T, Kato H, Naito S, Maeyama J-I, Masumi A, Kuramitsu M, Takizawa K, Mochizuki M, Ochiai M, Yamamoto A, Horiuchi Y, Nomura N, Watanabe S, Yamaguchi K. Two vaccine toxicity-related genes Agp and Hpx could prove useful for pertussis vaccine safety control. *Vaccine*, 25: 3355-3364, 2007

HTLV-1感染症の診断法の標準化と発症リスクの解明に関する研究

国立感染症研究所

浜口 功

HTLV-1対策と他の感染症対策の違い(平成22年まで)

	HTLV-1	エイズ	肝炎
感染者数(人)	100~150万人	1.5万人	150~200万人
新規感染者発生数(人/年間)	数千人	約1000人	最近非常に少ない
拠点病院の整備	無し	あり	あり
ウイルス量測定	保険未承認	保険承認	保険承認
治療方法	発症予防法無し 発症後の根治治療法無し	抗ウイルス剤で 発症予防可能	インターフェロン 治療などで多くが沈静化

HTLV-1感染に対する対策のおお一層の充実が望まれる。

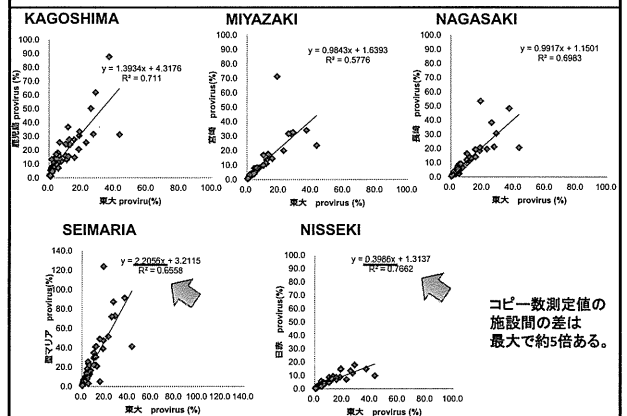
課題

HTLV-1の検査体制に改善すべき点が存在することが明らかになってきた。

- ✓ HTLV-1感染の抗体検出のスクリーニングにおいて、一定の比率で偽陽性が存在すること。
- ✓ 陽性検体に対し行われる確認検査で、陽性と確定できない判定保留検体が存在すること。
- ✓ 感染細胞におけるウイルスコピー数が予後因子の一つとなりうるが、コピー数測定(PCR法)の標準化が図られていない。

今後HTLV-1に対する総合的な対策を講じる上で、HTLV-1検査法の標準化は重要かつ緊急の対策が必要である。

各施設測定値の差異



TL-Om1細胞株を核酸検査の標準品として用いる

HTLV-1コピー数 1.8 copies/cell

核型 4倍体

HTLV-1挿入部位 1p13

HTLV-1挿入部位の同定

HTLV-1完全長配列決定

- 全長8942塩基。
- 国内の施設のPrimerとProbeは100%一致する。
- envのReceptor Binding Domainに93塩基(31アミノ酸)の欠失がある。

Env Δ125-155

Chromosome 1, NT_017380 164576-164570
に逆向きに挿入されている。

OncoGene (2005) 24, 6016-6025, 2-U

各施設の補正值

標準化のための共同研究

1. 各施設で標準品を独立3回測定。
2. 測定結果を感染研に報告、平行線定量法で理論値との隔たり(補正係数)を計算。

補正方法

$$\text{計算: } \frac{\text{実測値}}{\text{補正係数(倍)}} = \text{補正值}$$

各施設の補正係数

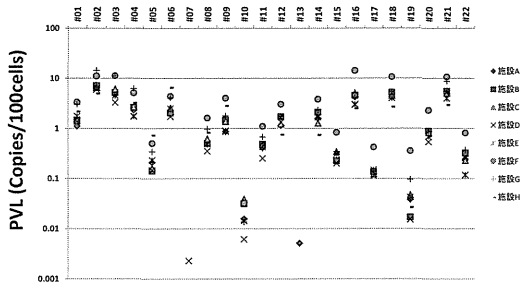
	施設 A	施設 B	施設 C	施設 D	施設 E	施設 F	施設 G	施設 H
20% 0.16%	1.27	1.58	0.84	4.45	1.38	2.45	0.91	3.16

20%, 4%, 0.8%, 0.16%の4点

*補正係数(倍)は、どの用量(100%~0.032%)の域でもほぼ同じ値となった。

HTLV-1核酸検査の補正係数の定義について、
補正係数: FACSとFISH解析から計算した理論値との隔たり(倍)

臨床検体の測定結果 補正係数による標準化



補正により施設間差縮小した。
うち5施設の値は、ほぼ一致した(5施設の差1.6倍)。

低コピー数検体の測定結果 Multi-center study

TL-Om1 (CFSE染色)をPBMCsで希釈し、低濃度の検体をそれぞれ作製した。各施設の方法に従い、DNAを抽出し、PVLを測定した。結果はDNA量の小さい順に示す。

DNA量

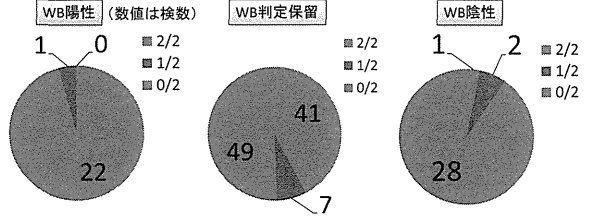
TL-Om1濃度	鹿児島1	鹿児島2	SRL1	鹿児島3	鹿児島4	鹿児島5	鹿児島6	鹿児島7	鹿児島8	鹿児島9	鹿児島10	鹿児島11	鹿児島12	鹿児島13	鹿児島14	鹿児島15	鹿児島16	鹿児島17	鹿児島18	鹿児島19	鹿児島20	鹿児島21	鹿児島22	
500ng	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
100ng	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
200ng	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
500ng	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1000ng	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2000ng	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
5000ng	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10000ng	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
20000ng	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
50000ng	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
100000ng	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
PBMCs	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

通常の測定時よりもDNA量を増加させることで、検出感度の上昇が期待できることが明らかになった。500ng以上では、0.002% (PVL = 0.004%, 4コピー/1x10⁵)まで検出可能であった。≥1μgでさらに検出感度が高いことが示唆された。

標準化作業の進捗

- ① TL-Om1細胞株を用い核酸検査の標準品の作製を行った。
- ② 標準品を用いた測定により各施設の補正係数を算出し利用することにより、測定値の施設間差が縮小し、HTLV-1コピー数測定の標準化を達成した。
- ③ 測定に用いる試料が500ng以上のDNA量の場合、PVL値 約 0.004% (4コピー/1x10⁵個)まで全施設が検出することが出来た。また1μg以上では、さらに高感度に測定できると考えられ、定性的測定を行う際は1μgを用いることとした。

日赤検体のWB検査結果と標準化PCRの結果の比較 (PCR陽性の割合)

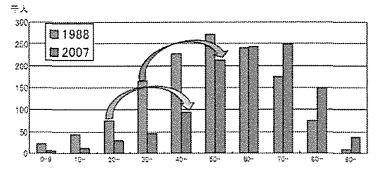


	WB陽性	WB判定保留	WB陰性
2/2 well 陽性	22 (95.7%)	41 (42.3%)	1 (3.2%)
1/2 well 陽性	1 (4.3%)	7 (7.2%)	2 (6.5%)
0/2 (陰性)	0 (0%)	49 (50.5%)	28 (90.3%)

日赤判定保留検体に対して、Q-PCRは約半数を陽性として判定できる能力を持つ。今後妊婦健診での判定保留例について解析を行う。

HTLV-1キャリア数の推移 (1988-2007)

(日赤の初回献血者データに基づく抗体陽性者数から推定)



年代	キャリア数	増減
1998年 20代	75,000	△20,000
2007年 40代	95,000	
1998年 30代	160,000	△55,000
2007年 50代	215,000	

妊婦判定保留例に対して厚労省研究班「板橋班」と「浜口班」での共同研究体制

