

と考えられる。今後培養条件の変更等により免疫原性の高い抗原を精製するには、各抗原に対する精製条件の最適化が必要であろう。

今回抗原精製 2 段階目のクロマトに Cellufine GCL-2000 を用いたゲル濾過を試行した。ここでの溶出は、特に DENV/WNV キメラ抗原において、BSA 程度の低分子量の範囲にまで広く検出された。このことから 293T 細胞中で発現したタンパク質は断片状から粒子状まで様々なサイズで存在していることが考えられる。前段階のクロマトでは親和性を有するタンパク質が、VLP 形成の有無などに関係なく回収されるため、小サイズ粒子のマイクロソームやタンパク質断片を分離することができる本方法は、アフィニティークロマト後の温和な分離精製に適していると考えられる。粒子サイズは抗原の免疫原性にも影響してくるため、不純物の除去と併せて上記 2 段階のクロマトは本課題が目的とする VLP の精製にも有効であると思われる。

以上のように、本研究は官民相互の連携効果が発揮され、計画通り或いは計画以上に進捗しているものと思われる。

E. 結論

DENV-VLP ワクチン抗原開発を前期官民共同研究から継続して推進し、以下の成果を得た。

(1) 発現・分泌されるキメラ DENV 抗原の性状をサンドイッチ ELISA 及び蔗糖密度勾配遠心法も加え解析した結果、

① DENV は蛋白間相互に連携して沈降速度の異なる 2 種の複合抗原を形成でき、

② 蛋白間相互作用で形成される複合抗原は沈降速度が遅く、

③ DENV のドメインを WNV のベースに発現すると沈降速度の遅いキメラ複合抗原が形成される、こと等を新たに見出した。また、

(2) DENV/WNV キメラ発現抗原の精製法を詳細に検討し、Cellufine Sulfate カラム法が有効な濃縮・精製法であることを示した。

以上のように、計画通り/計画以上の進捗が得られ、学術的に興味深い新知見が本年度も得られた。

F. 健康危険情報

該当事項なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

Makino Y, Suzuki T, Hasebe R, Kimura T,

Maeda A, Takahashi H, Sawa H. Establishment of tracking system for West Nile virus entry and evidence of microtubule involvement in particle transport. J Virol Methods. 2013 Oct 16;195C:250-257.

Niikura K, Matsunaga T, Suzuki T, Kobayashi S, Yamaguchi H, Orba Y, Kawaguchi A, Hasegawa H, Kajino K, Ninomiya T, Ijiro K, Sawa H. Gold Nanoparticles as a Vaccine Platform: Influence of Size and Shape on Immunological Responses in Vitro and in Vivo. ACS Nano. ACS Nano. 2013 May 28;7(5):3926-38.

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、小島朝人、鈴木忠樹、岩田奈織子、小谷治、高崎智彦、長谷川秀樹：デングウイルス VeroE6 継代株のマウスに対する病原性。第 61 回日本ウイルス学会学術集会、2013 年 11 月、神戸

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（一般財団法人阪大微生物病研究会）

特許第 5448836 号（登録日 平成 26 年 1 月 10 日）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、高橋秀宗（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）

1-2. 特許出願

1) 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：H25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 H25 年度に引き続き継続された。弱毒生痘そうワクチン株作製過程に得られたウイルス株の全塩基配列を決定し、その製造過程を明らかにした。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。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、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、同ワクチン製剤の生産性の向上に関する研究、等の研究がなされた。原液の長期保管における安定性評価を行い、60 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 9 箇月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。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約 11 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。

研究組織

- 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) 自衛隊中央病院診療科
阿部信次郎
- 5) 一般財団法人化学及血清療法研究所
大隈邦夫、横手公幸

A. 研究目的

細胞培養弱毒生痘そうワクチンは危機管理対策のひとつとして国家備蓄されている。非特定の国民への緊急及び予防的使用を想定し安全性、有効性の検証のために動物を用いた評価

系、及び臨床疫学研究における有効性の評価系などを構築しデータ、ワクチンの長期備蓄保存のための保存安定性データ、長期保存における安全性と有効性の解析データ、弱毒生痘そうワクチンの遺伝子解析などの特性解析、品質試験方法の精度向上のためのデータ、ワクチン製造施設の他製剤との共用の可能性を検討し、製造施設の稼働効率を高めること等で安定生産体制の維持と生産性向上を達成するためのデータを蓄積することが本研究班に与えられた目的である。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。

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 2010-2013 年に報告された文献を精査した。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、96 箇月目まで力価及び含湿度を決定した。また、中型プラーク含有率測定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) 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 回接種された健康成人の約 4 年後の抗体陽性率を再種痘群および初種痘群と比較した。中和抗体測定法を用いた。

- 4) 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シニア株 (Dryvax, MVA 等) により誘導される抗体プロファイルを、今年度はさらに検体数を増やして比較・解析した。

- 5) 霊長類に対する高度弱毒痘そうワクチン LC16m8 接種から致死性サル痘ウイルス感染症に対する防御効果および抗体誘導能に関する詳細な解析に関する研究。

カニクイザルとサル痘ウイルスの感染方法。12 頭のカニクイザル (*Macaca fascicularis*) を用いた。3 頭 (naive 群) にはワクチン接種することなく、3 頭 (D0 群) にはワクチン接種と同時に、3 頭 (D-3 群) にはワクチン接種 3 日後に、3 頭 (D-7 群) には 7 日後に、1 頭 (D-14 群) には 14 日目に、そして、1 頭 (D-28 日目) に皮下接種経路で 10^6 plaque forming unit (pfu) の Zr-599 株を感染させた。その後の臨床経過、血中ウイルスゲノム量の変化、IgG-ELISA によるワクシニアウイルスに対する抗体測定および IMV および EEV 関連抗体をプロテオミックス法により測定した。

- 6) 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。

天然痘流行期及び現行の痘そうワクチンの接種用法に関する国内外の文献調査を行った。

154 名の種痘歴の無い健康成人において米国承認備蓄ワクチン Dryvax を比較対照として 2004~2005 年に米国で実施された細胞培養弱毒痘そうワクチン LC16m8 の第 I/II 相無作為二重盲検臨床試験で取得された成績を再解析した。痘そうワクチン接種前、接種 30 日後、60 日後、180 日後及び 360 日後の Anti-Dryvax PRNT₅₀ のデータを解析し、中和抗体の持続を評価した。

- 7) 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 Liberia 株 (西アフリカ型) を育成カニクイザル (*Macaca fascicularis*) 4 頭に 10^6 PFU ウイルス量を皮下接種し、臨床症状を 22 日間観察した。観察期間中に経時的に採血し、血球動態と血漿中のサイトカイン量 (Luminex 解析) を測定した。観察期間終了後、ケタラール過麻酔による安楽殺後に病理学的解剖を実施した。瀕死となった動物はその時点で同様に解剖を行った。

- 8) LC16m8 株の親株と考えられるワクシニアウイルス株の遺伝子配列解析と LC16m8 株を継代することにより生じる LC16mO 型 MSP ウイルスの網羅的遺伝的解析。

千葉血清より化血研に譲渡されたワクシニアウイルスの保存バイアルに LC16 系統のウイルスと推測されるものが 3 株発見された。本研究では、これらウイルス株の遺伝子配列情報を得て、LC16m8 株のより祖先ウイルス株かを確認した。

- 9) 既知・未知のボックスウイルスを迅速に検出する方法の検討と開発。

2010 年に報告された広くボックスウイルスを検出できる PCR 用プライマーを検討した (Yu et al., J. Clin. Microbiol. 2010, 48, 268-276)。

【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。

2010 年から 2012 年の 3 年間の論文の中で、PubMed 上により検索された天然痘ワクチン接種による副作用報告に関する論文数は 10 報であったが、2013 年にはさらに 3 報の論文が発表された。全て天然痘ワクチン接種を受けた米国軍人またはその接触者に関する報告であった。

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

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, 96 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. 原液の長期保管における安定性評価を行い, 60 箇月目まで安定であることを確認した. また, 添加剤についても, 10 年 9 箇月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) 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 回接種された健康成人の約 4 年後の抗体陽性率は再種痘群では 93%であったのに対し, 初種痘群では 60%であった. この成績は Dryvax (NYCBH) や IMVANEX (MVA) と比較して同等及び顕著に高い値であることが示唆された.

- 4) LC16m8 の臨床評価に関する研究.

データベースに公開されている Dryvax 株接種血清の抗体プロファイルを同じ手法で解析し, 比較したところ, 主要抗原は驚くほど類似していた. B5R のみは, LC16m8 接種血清において抗体産生の頻度が低かったが, その原因としては, 変異・縮合によるエピトープの減少, 測定系の影響などが考えられ, 生体内での B5R の重要性とともに, 今後の検討が必要である.

- 5) 霊長類に対する高度弱毒痘そうワクチン LC16m8 接種から致死性サル痘ウイルス感染症に対する防御効果および抗体誘導能に関する詳細な解析.

LC16m8 接種 3 日後にはサル痘発症予防効果が誘導されていた. ただし, サル痘ウイルス感染時には中和抗体は誘導されていなかった. ワクチン接種 7 日後においても中和抗体は誘導されていなかったが, 強いサル痘発症予防効果が誘導された. ワクチン接種 14 日目に最も強い発症抑制効果が誘導された. ワクチン接種 3 日後および 7 日後には, IMV-および EEV-関連抗体の中でも A36R に対する抗体が誘導されている個体が認められた.

- 6) 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.

WHO の天然痘流行期の痘そうワクチンの接種用法に関する情報及び米国承認・備蓄痘そうワクチンである ACAM2000 (NYCBH 株) の添付文書において定期的な追加接種が推奨されていた.

中和抗体陽性率は接種 30 日後に LC16m8 群では 98%(118/120), Dryvax 群では 100%(24/24)であったが, 初回接種者の接種 360 日後の抗体陽性率は LC16m8 群では 84%, Dryvax 群では 88%であり同等であったが, ワクチン株に関係無く抗体陽性率に低下傾向が認められた. 加えて, 両群は 30 日後に 8 種類 (WR148, D13L, I1L, H3L, A27L, A13L, A56R, D8L) の共通抗原を認識した.

- 7) 劇症型サル痘発症機序の解明に関する研究.

劇症型死亡例は敗血症に起因する炎症性ケモカイン・サイトカインの上昇がみられ, 通常型死亡例ではサル痘感染に対する単球関連の炎症性ケモカインの上昇がみられた. いずれの死亡例においても瀕死期の好中球減少が特徴的であった.

- 8) LC16m8 株の親株と考えられるワクシニアウイルス株の遺伝子配列解析と LC16m8 株を継代することにより生じる LC16mO 型 MSP ウイルスの網羅的遺伝的解析.

温度感受性を有する 2 株は LC16mO あるいはそれに近い株であり, 温度感受性を示さない 1 株は LC16m8 株と 757 塩基異なるが *quasispecies* ではないことから, LC16 よりも祖先の株あるいはクローニングされた *Lister* 株であると考えられた.

- 9) 既知・未知のボックスウイルスを迅速に検出する方法の検討と開発.

2012 年にフィリピンで採材したコウモリの血餅・腸管から抽出した DNA を用いて PCR を実施した. その結果, 血餅の DNA を用いて Low GC primer で増幅した場合に当該サイズのコウモリボックスウイルスであることを確認するために遺伝子配列を決定中である.

D. 考察

霊長類を用いた LC16m8 株の有効性と副作用に関する研究.

霊長類において, LC16m8 接種からサル痘ウイルス感染によるサル痘発症予防効果誘導までの日数および LC16m8 接種によるワクチニアウイルスに対する IgG 抗体, 中和抗体, および, IMV と EEV 関連抗体の誘導能について解析した. ワクチン接種 3 日目には比較的強いサル痘発症予防効果が, ワクチン接種 7 日目にはサル痘ウイルス接種部位において潰瘍性病変が認められなかったことから, 極めて強いサル痘発症予防効果が成立していたものと考えられる. 興味深いことは, LC16m8 接種後 7 日目では抗体誘導が多くの個体で検出限度以下であったことである. サル痘発症予防効果には

液性免疫誘導だけでなく、細胞性免疫の誘導が重要であり、ワクチン接種3～7日目には既に誘導されているものと考えられる。D-14群の個体は1頭ではあるが、ウイルス血症は観察期間中常に検出感度以下であり、さらにIgG抗体誘導が最も弱く、さらにサル痘ウイルス感染後においてはEEV関連抗原(A34R, A36R および B5R)に対する抗体誘導がほとんど認められなかった。EEV抗原はサル痘ウイルスの個体内で増殖し感染が広がる時に機能する膜表面タンパク質である。これらの抗原に対して抗体誘導が認められないか、認められたとしても極めて弱かったという事実は、LC16m8接種14日目には極めて強いサル痘ウイルス増殖抑制能(サル痘発症抑制能)が誘導されていたことを示している。

昨年度は劇症型サル痘発症機序を病理学的に解析した。今年度は劇症型サル痘個体における炎症性ケモカイン・サイトカインの反応を解析した。この様な劇症型サル痘個体では細菌感染症(敗血症)が併発していることも病理学的に証明されているので、炎症性ケモカイン・サイトカイン反応が真にサル痘ウイルス感染症に起因するものではないと考えられる。この個体で上昇がみられた炎症性サイトカインは敗血症の際に上昇するとの報告があるため、これらの反応は敗血症に起因すると考えられた。一方、劇症型死亡例でみられた単球関連ケモカインの反応は通常型死亡例におけるそれとほぼ同様であり、サル痘ウイルス感染に対する反応と考えられた。前年度で報告したが、劇症型死亡例では典型的な発痘形成はみられず、組織学的に免疫不全状態であり、サル痘ウイルスが全身の臓器で増殖し 10^9 コピー数/ml量という非常に高いウイルス血症を維持したことが示唆されている。好中球減少症はサル痘ウイルスと細菌の増殖(易感染性)の原因の一つと考えられるが、これについては今後、さらに検討が必要である。

LC16m8 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。

天然痘テロに対する危機管理対策として、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 PRNT)の持続を調査した。

中和抗体陽性率については再種痘群では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、約4年後には抗体陽性率が約60%となった。今回確認された初種痘群の抗体陽性率の低下傾向については、今後も調査対象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。

しかしながら一方で、横手らの報告によると、こ

のような初種痘群における中和抗体陽性率の低下傾向は、化血研が種痘経験の無い健康成人を対象として米国で行った痘そうワクチンLC16m8の第1相臨床試験で比較対照として設定した米国の前国家備蓄ワクチンであるDryvax(NYCBH株)の接種群においても確認されていることから、弱毒株であるLC16m8に特有の事象ではないと考えられる。

LC16m8接種を受けたヒトにおけるEEV関連抗原のひとつであり、感染防御免疫誘導に重要と考えられるB5に対する反応性を詳細に解析した。再解析によるDryvax接種血清との直接的な比較において、誘導される抗体はB5に対する抗体誘導を除き、LC16m8株とDryvax株免疫群において驚くほど似ていた。LC16m8は天然痘撲滅に寄与したDryvaxと非常に類似した認識抗原プロファイルを示す抗体を誘導でき、それらの抗体は防御や中和に重要であると考えられている5種類の膜たん白質を含む8種類の抗原たん白質(B5に対する抗体誘導を除く)を共通認識した。この成績はLC16m8の天然痘に対する有効性を支持するものと考えられる。更に、LC16m8の天然痘に対する有効性をより直接的に評価するために、痘そうウイルスに対する中和抗体価測定を米国CDCとの共同研究として実施中である。

B5に対する応答は、LC16m8集団においては頻度が低かった。これはLC16m8株は、EEVの主要抗原B5タンパク質が切断型として発現していることに由来していると考えられる。確かにLC16m8接種群ではB5タンパク質に対する免疫誘導は認められないか、極めて弱いことが再確認された。しかし、ワクチンとしての有効性にどのように影響を与えるかが議論となっている。確かに抗B5抗体の機能については、防御のために決定的に重要であるという報告がある(Putz 2005)。一方、単独の抗原に対する抗体が防御能の全てを担うわけではなく、複数の抗体が関与していることが、ワクチン接種血清のdepletion実験から示されている(Benhnia 2013)。これは、IMV, EEVの両方で共通である。

既接種群の長期免疫においては、抗B5抗体は検出されたものの量は多くなかった。これはDryvax接種血清でも同様であった。これらの結果からは、抗B5抗体は長期には維持されず、再曝露に際しては、ブースター効果によって血中抗体量が増加することで防御に寄与すると考えられる。ELISAを用いた先行研究とは必ずしも一致せず、系の違いの影響が考えられる。

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者については毎年、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生痘そうワクチン 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ないため、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。また、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、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結果、中和抗体陽性率は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なく確認されたことから、LC16m8株という弱毒株に特有の事象ではないと考えられる。更に、LC16m8と同じ第3世代痘そうワクチンであるIMVANEX（MVA株、Bavarian Nordic社）は接種2年後の抗体陽性率が約5%であると報告されていることから、LC16m8を単回接種により獲得された中和抗体価の持続期間は長いと考えられる。

日本では、痘瘡ウイルスが用いられるバイオテロリズムの可能性に備えて、高度弱毒化細胞培養痘そうワクチン LC16m8 の再生産と備蓄がなされている。このワクチンは比較的安全性が高く、重度の副作用（進行性種痘疹、種痘性湿疹、脳炎、等）の報告はない。しかし、現状では10万人程度の使用実績しかなく、海外での天然痘ワクチン関連の副作用報告に注意を払う必要がある。昨年度の報告に加えて、2013年度の天然痘ワクチンによる副作用事例の報告を調査した。さらに3報の報告がなされた。最近の4年間の天然痘ワクチン接種による副作用報告を精査したところ、すべてACAM2000の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。性的接触によりワクチニアウイルスに感染した患者は抗ワクチニア抗体（Vaccinia Immune globulin Intravenous, VIGIV）の投与による治療がなされていた。日本においても、痘そうワクチンが備蓄されていることから、副作用報告には注意を払い、情報収集につとめ、また、副作用発生時に対する対応に関する研究を実施することが重要と考えられる。

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℃以下で保存した場合、保管後96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。

ワクチン原液の安定性試験において-80℃で保管する場合、保管後60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℃以下の冷蔵保存でも少なくとも、保管後129箇月目までは毒性等に影響がないことが確認された。このような長期にわたる保存天然痘ワクチンの品質評価に関する研究は世界的にもなく、天然痘ワクチン備蓄政策において重要なデータを提供すると考えられる。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。

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においては、他製剤との共用化が実現されつつあり、生産性向上に寄与できるものと考えられる。但し、製剤化工程においては、PIC/Sガイドラインをクリアする必要がある。今後も引き続き検討を継続する。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く必要がある。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していく必要がある。

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、生産性の向上への提言がなされた。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yoshikawa T, Saijo M, Morikawa S. Emergence of zoonotic orthopox virus infections. In Viral

- Infections and Global Change (ed. Sigh SK), pp377-387, 2014, Wiley Blackwell, New Jersey
- 2) Yoneda M, Georges-Courbot MC, Ikeda F, Ishii M, Nagata N, Jacquot F, Raoul H, Sato H, Kai C. Recombinant measles virus vaccine expressing the Nipah virus glycoprotein protects against lethal Nipah virus challenge. PLoS One. 2013;8(3):e58414.
 - 3) Hotta A, Fujita O, Uda A, Sharma N, Tanabayashi K, Yamamoto Y, Yamada A. and Morikawa S. In vitro Antibiotic Susceptibility of Francisella tularensis isolates from Japan. Jpn. J. Infect. Dis. 2013;66(6):534-6.
 - 4) Fujita O, Hotta A, Uda A, Yamamoto Y, Fujita H, Shinya F, Asano S, Morikawa S, Tanabayashi K, Yamada A. Identification of the source of Francisella tularensis infection by a multi-locus variable-number tandem repeat analysis. Jpn. J. Infect. Dis. 2013;66(6):543-5.
 - 5) Toru Takahashi, Ken Maeda, Tadaki Suzuki, Aki Ishido, et al. , Shigeru Morikawa, Masayuki Saijo. The First Identification and Retrospective Study of Severe Fever with Thrombocytopenia Syndrome in Japan. J Inf Dis., in press
 - 6) Neekun Sharma, Akitoyo Hotta, Yoshie Yamamoto, Akihiko Uda, Osamu Fujita, Toshio Mizoguchi, Junji Shindo, Chun-Ho Park, Noboru Kudo, Hitoshi Hatai, Toshifumi Oyamada, Akio Yamada, Shigeru Morikawa, and Kiyoshi Tanabayashi. Serosurveillance for Francisella tularensis among wild animals in Japan using a newly developed competitive ELISA. Vector-Borne and Zoonotic Diseases, in press
 - 7) Arai S, Nguyen ST, Boldgiv B, Fukui D, Araki K, Dang CN, Ohdachi SD, Nguyen NX, Pham TD, Boldbaatar B, Satoh H, Yoshikawa Y, Morikawa S, Tanaka-Taya K, Yanagihara R, Oishi K. Novel Bat-borne Hantavirus, Vietnam. Emerg Infect Dis. 2013 Jul;19(7):1159-61.
 - 8) Sunohara M, Morikawa S, Fuse A, Sato I. Role of promoter element in c-mpl gene expression induced by TPO. Okajimas Folia Anat Jpn. 2013;89(4):131-5.
 - 9) Sakai K, Yoshikawa T, Seki F, Fukushi S, Tahara M, Nagata N, Ami Y, Mizutani T, Kurane I, Hasegawa H, Saijo M, Komase K, Morikawa S, and Takeda M. Canine Distemper Virus Associated with a Lethal Outbreak in Monkeys Readily Adapted to Use Human Receptors. J Virol. 2013, 2013 Jun;87(12):7170-5.
 - 10) 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. 2013, 87(2): 1105-1114
 - 11) Neekun Sharma, Akitoyo Hotta, Yoshie Yamamoto, Osamu Fujita, Akihiko Uda, Shigeru Morikawa, Akio Yamada, Kiyoshi Tanabayashi. Detection of Francisella tularensis-specific antibodies in patients with tularemia using a novel competitive enzyme-linked immunosorbent assay. Clinical and Vaccine Immunology, 2013 20(1): 9-16
2. 学会発表
- 1) 江藤亜紀子, 齋藤智也, 横手公幸, 金谷泰宏. 天然痘ワクチンLC16m8接種により誘導される抗体プロファイルと中和抗体価との関連についての解析. 第17回日本ワクチン学会学術集会 三重(2013.11)
- 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 サイトカイン抑制シグナル（SOCS）分子の拮抗分子を発現する組み換えBCG（rBCG-SOCS1DN）を作製し、ワクチン効果を検討した。rBCG-SOCS1DNは親株BCGに比較し、強力かつ長期間の免疫反応が誘導された。また、これらの免疫反応は自然免疫系分子も関与していることが示唆された。

研究組織

保富康宏：医薬基盤研究所

松尾和浩：日本ビーシージー製造株式会社

松本壮吉：新潟大学大学院医歯学総合研究科

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。

生体は感染症等において過剰な免疫反応を抑制するメカニズムとして宿主免疫反応を負に調節するサイトカイン抑制分子（SOCS）を活性化させる。多くの病原体において生体のこの機能を利用し、宿主免疫からの回避を行っていることが近年数多く報告されている。BCGにおいても感染細胞のSOCS活性を上昇させることが認められ、この機能を抑制すればワクチン効果が増強されるのではないかと考えられる。

本研究では、わが国で現在用いられているBCGに、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た新規結核ワクチンの開発を行うことを目的とした。

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以上に比較し、自然免疫系を介した強い免疫反応を誘導し、安全性も高いことが示された（図1）。

（松尾和浩）

rBCG-SOCS1DNはマウスでの強毒結核菌噴霧感染系において、低用量で免疫した場合、

あるいは免疫期間を24週に延長した場合に、肺および脾臓で有意な感染防御効果が、親株と比較して増強することがわかり、実用化への可能性が示唆された（図2）。

（松本壮吉）

rBCG-SOCS1DNは、BALB/cマウスでの抗体産生に関しては 22-24kDa蛋白質を主要標的とすることが分かったが、抗体価自体は、対照のrBCG-pSO免疫に比べ低調であった。rBCG-SOCS1DNを皮下免疫により、防御効果と、結核菌防御抗原に対して脾臓由来T細胞の防御的応答が認められた（図3）。

（梅村正幸）

rBCG-SOCSDN 接種マウスにおけるDNAマイクロアレイ解析により抗結核防御に関与する遺伝子候補が見出された（図4）。

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。

多くの病原体がSOCS分子の活性化を利用し、生体の免疫反応から回避していることが近年多数報告されている。結核菌においても感染マクロファージやDCにおいて同様のことが認められており、BCGワクチンにおいても同様である。このことから本研究ではBCGにSOCS1アンタゴニスト分子を発現させ、BCGのワクチン効果増強を試みた。

SOCS1分子を抑制するrBCG-SOCSDN感染では自然免疫のみで生体から排除されることから、従来のBCG以上に安全性が確保されることが考えられる。

生後すぐに投与されるBCGの効果は約10歳前後でピークを迎え、その後効果は減弱していく。本研究ではrBCG-SOCSDNにおいては親株BCGに比較し、生体から早期に排除されるにもかかわらず、免疫反応が長期に持続することから、理想的なBCGになりうる可能性が示唆された。

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) Watanabe K., Matsubara A, Kawano M, Mizuno S, Okamura T, Tsujimura Y, Inada H, Nosaka T, Matsuo K. and Yasutomi Y. Recombinant Ag85B vaccine by taking advantage of characteristics of human parainfluenza type 2 virus vector showed Mycobacteria-specific immune responses by intranasal immunization. Vaccine in press
- 2) Kobiyama K., Aoshi T., Narita H., Kuroda E., Hayashi M., Tetsutani K., Koyama S., Mochizuki S., Sakurai K., Katakai Y., Yasutomi Y., Saijo S., Iwakura Y., Akira S., Coban C. and Ishii KJ. A non-agonistic

Dectin-1 ligand transforms CpG into a multitask nano-particulate TLR9 agonist.

Proc.Natl.Acad Sci. USA in press

3) Wada T, Kohara M, Yasutomi Y.DNA vaccine expressing the non-structural proteins of hepatitis C virus diminishes the expression of HCV proteins in a mouse model. Vaccine 2013;31:5968-5974.

4) Kitagawa H, Kawano M, Yamanaka K, Kakeda M, Tsuda K, Inada H, Yoneda M, Sakaguchi T, Nigi A, Nishimura K, Komada H, Tsurudome M, Yasutomi Y, Nosaka T, Mizutani H. Intranasally administered antigen 85B gene vaccine in non-replicating human Parainfluenza type 2 virus vector ameliorates mouse atopic dermatitis. PLoS One. 2013 8(7): e66614

5) Shimozawa N, Ono R, Shimada M, Shibata H, Takahashi I, Inada H, Takada T, Nosaka T, Yasutomi Y.Cynomolgus monkey induced pluripotent stem cells established by using exogenous genes derived from the same monkey species. Differentiation. 2013 85:131-139.

6) Tajiri K, Shimojo N, Sakai S, Machino-Ohtsuka T, Imanaka-Yoshida K, Hiroe M, Tsujimura Y, Kimura T, Sato A, Yasutomi Y, Aonuma K.Pitavastatin regulates helper T-cell differentiation and ameliorates autoimmune myocarditis in mice. Cardiovasc Drugs Ther. 2013, 27:413-424.

7) Saito A, Nomaguchi M, Kono K, Iwatani Y, Yokoyama M, Yasutomi Y, Sato H, Shioda T, Sugiura W, Matano T, Adachi A, Nakayama EE, Akari

H.TRIM5 genotypes in cynomolgus monkeys primarily influence inter-individual diversity in susceptibility to monkey-tropic human immunodeficiency virus type 1. J Gen Virol. 2013 Jun;94(Pt 6):1318-24.

8) Yoshida T, Omatsu T, Saito A, Katakai Y, Iwasaki Y, Kurosawa T, Hamano M, Higashino A, Nakamura S, Takasaki T, Yasutomi Y,

Kurane I, Akari H.Dynamics of cellular immune responses in the acute phase of dengue virus infection. Arch Virol. 2013,158:1209-20.

9) Tougan T, Aoshi T, Coban C, Katakai Y, Kai C, Yasutomi Y, Ishii KJ, Horii T.TLR9 adjuvants enhance immunogenicity and protective efficacy of the SE36/AHG malaria vaccine in nonhuman primate models. Hum Vaccin Immunother. 20139(2) 283-290.

10) Nomaguchi M, Yokoyama M, Kono K, Nakayama EE, Shioda T, Saito A, Akari H, Yasutomi Y, Matano T, Sato H, Adachi A.Gag-CA Q110D mutation elicits TRIM5-independent enhancement of HIV-1mt replication in macaque cells. Microbes Infect. 2013 5:56-65.

<松尾>

1)Sato H, Jing C, Isshiki M, Matsuo K, Kidokoro M, Takamura S, Zhang X, Ohashi T, Shida H. Immunogenicity and safety of the vaccinia virus LC16m8Δ vector expressing SIV Gag under a strong or moderate promoter in a recombinant BCG prime-recombinant vaccinia virus boost protocol. Vaccine 31:3549-57 (2013)

2) Watanabe K, Matsubara A, Kawano M, Mizuno S, Okamura T, Tsujimura Y, Inada H, Nosaka T, Matsuo K, Yasutomi Y.

Recombinant Ag85B vaccine by taking advantage of characteristics of human parainfluenza type 2 virus vector showed *Mycobacteria*-specific immune responses by intranasal immunization. *Vaccine*, in press (2014).

< 松本 >

1) Nishiuchi, Y., Tamaru, A., Suzuki, Y., Kitada, S., Maekura, R., Tateishi, Y., Niki, M., Ogura, H., and S. Matsumoto, 2014. Direct detection of *Mycobacterium avium* in environmental water and scale samples by loop-mediated isothermal amplification. *J Water Health*, in press.

2) Manabu I, Nagi S., Chadeka E., Mutungi F., Osada-Oka M., Ono K., Oda T., Michinori T., Ozeki Y., Dan Justin Yombo K., Okabe M., Niki M., Hirayama Y., Fukui M., Kobayashi K., M. Matsumoto, M. Shimada, S. Kaneko, H. Ogura, Y. Ichinose, SM. Njenga, S. Hamano, and S. Matsumoto. 2013. Relationship between *Mycobacterium tuberculosis* and hookworm infections among school children in Mbita, Kenya, *J Trop Dis*. in press.

3) Yamashita, Y., Y. Hoshino, M. Oka, S. Matsumoto, H. Ariga, H. Nagai, M. Makino, K. Ariyoshi, and Y. Tsunetsugu-Yokota. 2013. Multicolor Flow Cytometric Analyses of CD4(+) T Cell Responses to *Mycobacterium tuberculosis*-Related Latent Antigens. *Jpn J Infect Dis* 66:207-215.

4) Tateishi, Y., A. Tamaru, Y. Ogura, M. Niki, T. Wada, T. Yamamoto, K. Hirata, T. Hayashi, and S. Matsumoto. 2013. Whole-Genome Sequence of the Potentially Hypertransmissible Multidrug-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Beijing Strain

OM-V02_005. *Genome Announc* 1 e00608-13.

5) Taniguchi, K., T. Takii, S. Yamamoto, J. Maeyama, S. Iho, M. Maruyama, N. Iizuka, Y. Ozeki, S. Matsumoto, T. Hasegawa, Y. Miyatake, S. Itoh, and K. Onozaki. 2013. Reactivation of immune responses against *Mycobacterium tuberculosis* by boosting with the CpG oligomer in aged mice primarily vaccinated with *Mycobacterium bovis* BCG. *Immun Ageing* 10:25.

6) 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. 2013. Antigen 85A and mycobacterial DNA-binding protein 1 are targets of immunoglobulin G in individuals with past tuberculosis. *Microbiol Immunol* 57:30-37.

7) Fukuda, T., T. Matsumura, M. Ato, M. Hamasaki, Y. Nishiuchi, Y. Murakami, Y. Maeda, T. Yoshimori, S. Matsumoto, K. Kobayashi, T. Kinoshita, and Y. S. Morita. 2013. Critical roles for lipomannan and lipoarabinomannan in cell wall integrity of mycobacteria and pathogenesis of tuberculosis. *MBio* 4:e00472-00412.

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

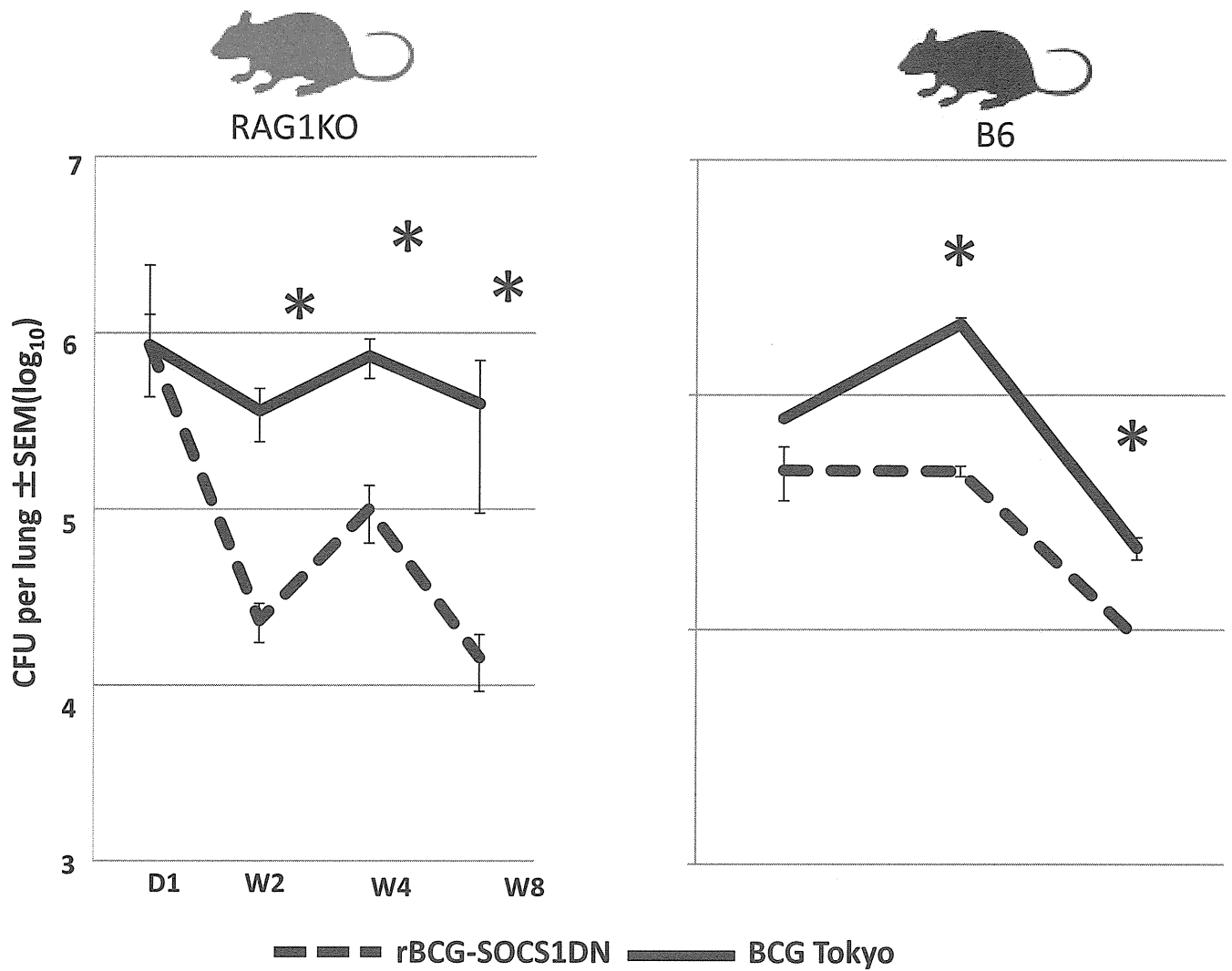


図1 マウス肺内における菌数の変化

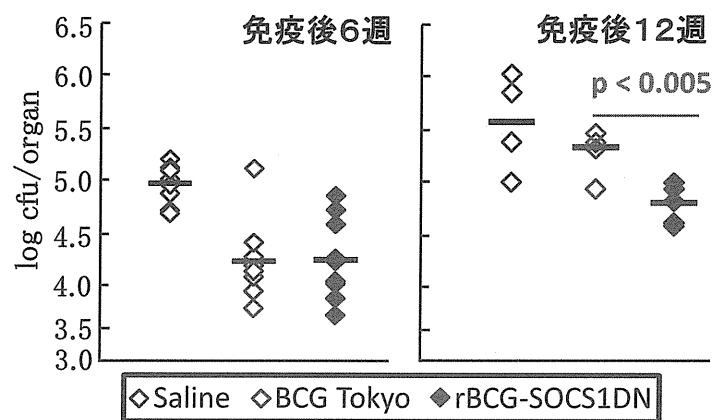


図2 免疫マウスに結核菌接種後の肺における菌数

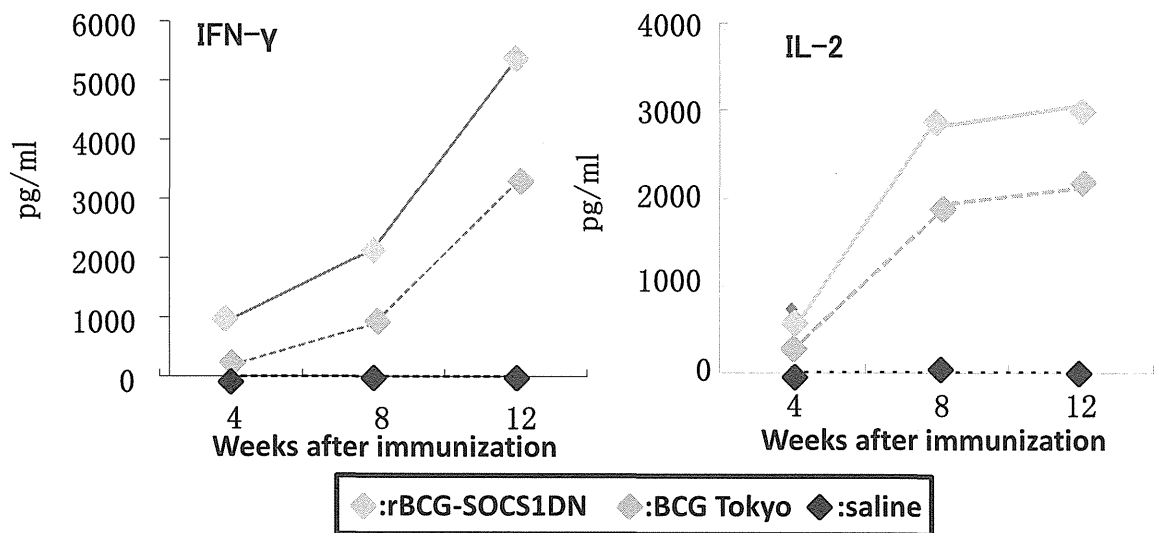
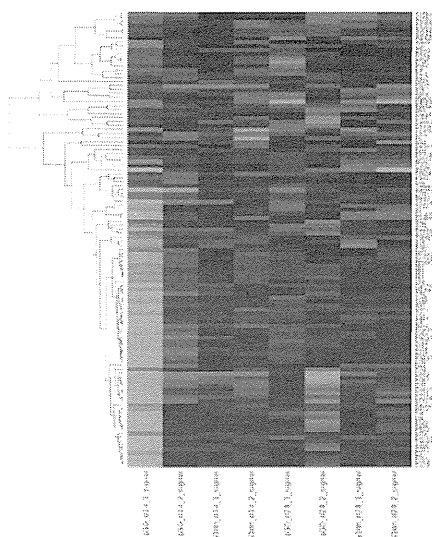
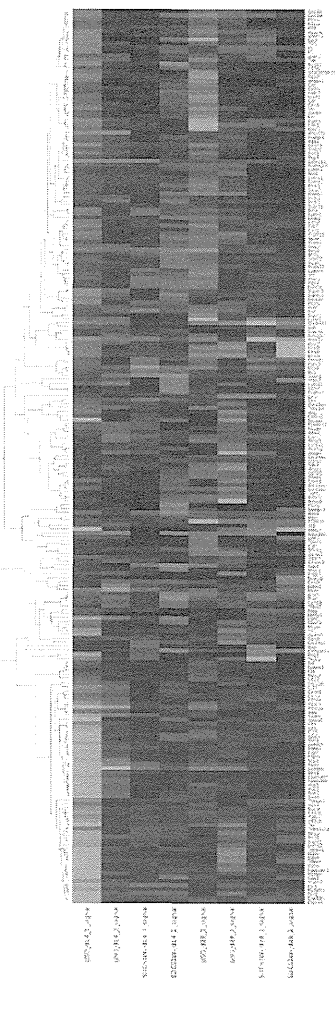


図3 抗原特異的サイトカインの産生

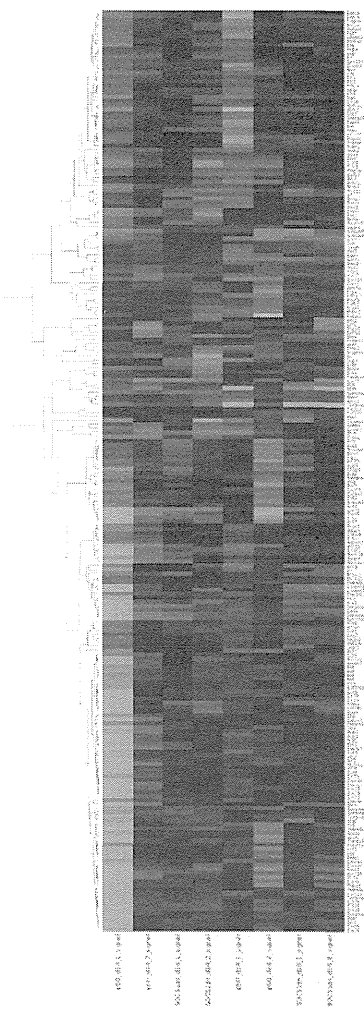
1) Inflammatory related genes



2) Adhesion related genes



3) Cell migration related genes



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

POCUBE の H5/A インフルエンザ診断キットに用いた抗 H5 HA 抗体のエピトープ認識部位の解析により、開発したキットは広くアジアに流行する H5N1 インフルエンザウイルス迅速診断キットとして有用であることが明らかとなった。ウイルスのゲノム情報・立体構造情報に基づいて独自に同定した H5 HA 分子上の新規エピトープペプチド配列に立体構造保持フレームを付加すると、ウイルス粒子立体構造を認識する抗体の産生増強効果を認め、更に、T 細胞エピトープを付加することにより、ペプチドの免疫原性を飛躍的に高めることが出来た。この様な独自に *in silico* デザインされたペプチドに対する抗体の一部は、適当な界面活性剤利用により POCUBE 用のキットとしても構築可能であったことから、我々の手法の将来性が期待される。

研究組織

- (1) 国立感染症研究所
免疫部 横田 恭子、大西 和夫
- (2) 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
- (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) 各クレードを代表する H5N1 インフルエンザウイルス(A/VietNam/1194/2004, A/VietNam/1203/2004, A/ Indonesia/5/2005, A/Turkey/12/2006, A/Anhui/01/05IBCDC-RG-5) および陰性コントロールとして H1N1 ウイルス (A/Narita/1/2009) の HA やその変異体、H5 HA(VN1194 株由来)と H1 HA の塩基配列をドメイン間で入れ替えた3種のキメラ HA 遺伝子を PCR クローニングして発現ベクターに組み込み、

293 にトランスフェクトしてウエスタンブロットで細胞発現を確認した後、OM-b 抗体への反応性をフローサイトメーターで解析した。OM-b に対する中和逃避ウイルスを選択し、それらの HA 配列を解析した。また、*in silico* 解析のため、H5 HA(VN1194 株, PDB ID: 2IBX)および H1 HA(PDB ID: 3LZG)の結晶構造を用いた。各種キメラ HA および変異型 HA 構造のモデリングには Molecular Operating Environment (MOE) ver. 2013.08 software を使い、Influenza Virus Resource データベースより入手した HA のエピトープアミノ酸のホモロジー解析を行った。(横田)

2) インフルエンザウイルス HA の型共通エピトープおよび型特異的エピトープを独自のバイオインフォマティクス手法を用いて探索した。特定した候補エピトープ領域の立体構造について *in silico* 予測を行なうために、NCBI、EMBL-EBI、PDB_RSC1などのデータベース、解析手法として BLAST、GENETYX、ClustalX、TreeVie、MOE、NAMD、PSIPRED を使用した。また、必要に応じて独自のプログラムを自作した。更に、デザインしたペプチド抗原に対する抗体応答を強化させるため、ヘルパー T 細胞の働きを特定の抗原に集中させることが可能な OVA 特異的 T 細胞受容体遺伝子トランスジェニックマウス (以下 DO11.10) を利用した。このマウスに HA 分子表面の標的構造 2 カ所のペプチドとそれに T 細胞受容体 (DO11.10) エピトープ・ペプチドを融合させたものの計 4 種類を免疫し、これらの

抗原により惹起される抗体群を比較検討した。(大西)

3) 分子系統データ解析や分子動力学シミュレーション等の手法を用いて、H5 HA で保存されており且つ立体構造の表面上に位置し抗原部位と成り得る領域を 5 カ所選定した。この部分のペプチド(16~22 アミノ酸)を合成し、マウスに免疫後ハイブリドーマを作製し、モノクローナル抗体クローンのスクリーニングを行った。抗体クローンの亜型特異性の評価および抗原抗体反応の向上の目的とした抗原および抗体を各種界面活性剤による変性条件の最適化を ELISA 試験により行った。(影山)

4) 小型発光免疫自動分析装置「POCUBE®」を用いた高病原性鳥インフルエンザ H5N1 検出キットの更なる性能改善のために、上述の HA 立体構造予測により合成したペプチドを用いて作製された新規 H5 HA ペプチド特異的モノクローナル抗体について、不活化ウイルス (A/Vietnam/ 1194/2004) を用い、POCUBE 用キットとしての評価を行った。今回得られた抗体は、反応液中に SDS を添加すると反応性が向上することが影山らにより確認されているため、SDS および Empigen を用いて界面活性剤が POCUBE 測定系に与える影響について検討した。(西村)

5) ホーチミン市のパスツール研究所(HCM Pasteur)の Dr. Long 部長の研究室に設置した POCUBE による新たな H5 HA 検出状況を視察討議した(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) 抗体作製時の免疫に用いた VN1194 株以外の H5 HA に対する OM-b の反応性を調べた結果、OM-b はすべてのクレードの H5 HA に反応した。また、OM-b は HA1 にエピトープがあり、反応性の程度は弱いものの、HA の globular ドメインを認識することが分かった。中和逃避変異ウイルスの HA 配列解析の結果、OM-b は 43 番目および 46 番目のアミノ酸(D43, G46)が主要なエピトープ部位であることが明らかとなった。これらエピトープアミノ酸の重要性は立体構造予測からも裏付けされ、特に D43 はアジアで報告されている様々な H5N1 インフルエンザウイルスのクレード間で高度に保存されていた。

2) 独自に探索した HA 分子上の 6 つのエピトープを合成した。抗体作成を行う際、環化 Poly-Proline を用いた立体構造保持フレームの効果を検討し、合成ペプチド・エピトープの立体構造をウイルス粒子

表面上の立体構造に近似させることにより、抗体のウイルス粒子反応性を増強できた。更に、T 細胞受容体トランスジェニックマウス (DO11.10) と T 細胞エピトープ付加合成ペプチドを組み合わせれば免疫原性を高める効果がある事を確認した。

3) ELISA 法によるスクリーニングの結果、5 ヶ所の内 1 ヶ所のペプチドを免疫したマウスから H5 抗原に対して反応性を示す抗体クローンが 9 個得られた。これらは H1 および H3 亜型ウイルス抗原に対して反応性を示さなかった。また、界面活性剤処理による抗原抗体反応の向上の検討を行ったところ、SDS や Empigen を用いることにより反応性の向上がみられた。

4) キットに含まれる反応液中の SDS 濃度を変えて、試薬ブランク値 (前処理液) および FluH5 コントロールを測定した結果、0.02% までは現行 (SDS-) とほぼ同等の値であることを確認した。また、新たに得られた 4 種の抗体 (36A3、5A7、7D4、7D6) および OM-b (R1)、1C10 (R2) を用いて現行の組合せを含む抗体組合せ 25 通りについて評価を行ったところ、2 通り (R1; 5A7×R2; 1C10 および R1; 7D6×R2; 1C10) の抗体組合せについて良好な結果を得た。

5) ホーチミン市のパスツール研究所(HCM Pasteur)で今年新たに診断された H5N1 感染 2 症例の臨床検体を検査した結果、POCUBE H5/A キットは陽性となっており、診断キットとしての有用性が再確認された (HCM Pasteur Dr. Long 部長との共同研究)。

なお、これまでの NIHE と HCM Pasteur 研究所の検査結果をまとめ、共同研究の成果として論文投稿中である (Tsunetsugu-Yokota et al., Development of a sensitive novel diagnostic kit for the highly pathogenic avian influenza A (H5N1) virus, submit, Jan. 2014)。

また、OM-b epitope の解析に関する論文も投稿中である (Kobayashi-Ishihara et al., Broad Cross-Reactive Epitopes of the H5N1 Influenza Virus Identified by Murine Antibodies Against the A/Vietnam/1194/2004 Hemagglutinin. Submit, Feb. 2014)

D. 考察

異なるクレード由来の H5 HA およびキメラ HA、変異型 H5 HA との結合性を調べることにより、H5 HA 検出キットに用いられている OM-b のエピトープが HA1 の抗原性サイト C に一致していた。抗原性サイト C は他の抗原性サイトに比べ H5 HA 間で変異が起こりにくいという報告もあり、実際に本研究でも OM-b エピトープが H5N1 間で高度に保存されて

いることが示された。特に、ここ数年アジアで発生した H5N1 株における保存性は 94.7%と見積もられ、アジアにおける H5N1 検出に OM-b が適していることが期待された。

合成ペプチド・エピトープの立体構造をウイルス粒子表面上の立体構造に近似させる方法として、環化 Poly-Proline を用いた立体構造保持フレームの効果により、作出した抗体のウイルス粒子反応性を増強することが出来た。このフレームは、本来の HA 分子上でエピトープ・ペプチドが呈する立体構造を再現し易くするためペプチド両端の距離を固定するために用いたのであるが、環化 Poly-Proline の剛性が期待したより低く、ペプチド両端の距離を厳密に固定できなかった。現在、より剛性の強い素材を探索している。一方、*In silico* で設計した抗原ペプチドの抗原性を高めるため、抗原ペプチドに T 細胞受容体エピトープを連結し、その T 細胞受容体をトランスジーンとして持つマウスに免疫することにより、T 細胞ヘルプを強力に誘導するシステムを考案した。結果は有望であり、今後特許取得も視野に入れて研究を進めて行く。また、今回ペプチド免疫で得られた抗体クローンは H5 HA の保存されている領域を免疫原としており、H5N1 ウイルスの幅広いクレードの HA 抗原に対して反応性を示すと考えられる。これらの抗ペプチド抗体を POCube システムに組み込むことにより、現在のキットより更に高い感度や汎用性を有するキットの開発も可能であると思われる。更に、H5 以外の H7 などのヒトへの感染が危惧されているウイルスについても、同様の立体構造解析手法を用いて、高感度かつ特異的な迅速診断法の構築が期待される。

E. 結論

H5 HA あるいは H5 と H1 のキメラ HA を細胞に発現させて H5 HA 検出キットに用いた OM-b 抗体の結合性を解析し、中和抗体逃避ウイルスの結果とあわせ、OM-b 抗体のエピトープを決定した。ホモロジー検索により、この抗体を用いた POCube H5/A kit は、広くアジア地域に流行する H5N1 インフルエンザウイルスを検出可能であることが示唆された。

インフルエンザウイルスのゲノム情報・立体構造情報に基づいて独自に探索した H5 HA 分子上の 6 つの新規エピトープを特定し、これらのペプチド配列に独自の新技术として立体構造保持フレームを付与すると、ウイルス粒子立体構造を認識する抗体の産生増強効果を認めた。更に、T 細胞エピトープを付加することにより、ペプチドの免疫原性を飛躍

的に高めることが出来た。

これまでに HA 立体構造予測により合成したペプチドを用いて作製した H5 HA 特異的な新規モノクローナル抗体は、H1 および H3 抗原に対しては反応性を示さなかったことから、H5 抗原に高い特異性を有していることが示唆され、SDS や Empigen 処理により反応性が向上する事が明らかとなった。これらの抗ペプチド抗体をキットに応用し、POCube で性能評価を行った結果、迅速キットとして使用可能な新たな抗体組合せを 2 通り見出した。

以上、独自の手法でコンピューター予測により同定し作製したペプチドを抗原として得られる抗体は、将来的により汎用性の高い高感度診断キットの構築を可能にすることが期待された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yamashita, Y., Hoshino, Y., Oka, M., Matsumoto, S., Ariga, H., Nagai, H., Makino, M., Ariyoshi, K., Tsunetsugu-Yokota, Y.: Multicolor flow cytometric analyses of CD4+ T cell responses to Mycobacterium tuberculosis-related latent antigens. *Jp.J.Infect.Dis.*, 3:207-215, 2013.
- 2) Tsunetsugu-Yokota, Y and Muhsen, M. Development of human dendritic cells and their role in HIV infection: antiviral immunity versus HIV transmission. *Front. Microbiol.* 4:1-10, 2013.
- 3) Ikeno, S., Suzuki, M., Muhsen, M., Ishige, M., Kobayashi-Ishihara, M., Ohno, S., Takeda, M., Nakayama, T., Morikawa, Y., Terahara, K., Okada, S., Takeyama, H., Tsunetsugu-Yokota, Y.; Sensitive detection of measles virus infection in the blood and tissues of humanized mouse by one-step quantitative RT-PCR. *Front. Microbiol.*4:1-8, 2013.

2. 学会発表

- 1) Takahashi, H., Ohnishi, K., Nishimura, K., Takayama, I., Nakauchi, M., Nagata, S., Tsunetsugu-Yokota, Y., Tashiro, M., Kageyama, T. Development of monoclonal antibodies specific for H5 HA and their application to rapid detection of influenza A/H5N1 virus. Options for the Control of Influenza VIII, Cape Town, 5-10 September 2013.
- 2) 西村 研吾, 曾家 義博, 服部 静夫, 影山 努,

大西 和夫、高山 郁代、小林 美栄、高橋 仁、横田 恭子「化学発光免疫測定法を用いた高感度 H5HA 検出系の開発とベトナムにおける H5N1 感染試料を用いた検出感度の検討」第 27 回インフルエンザ研究者交流会シンポジウム、札幌、2013 年 6 月 29 日

- 3) 小林 (石原) 美栄、高橋仁、西村研吾、高山郁代、大西和夫、板村繁之、影山努、横田 (恒次) 恭子「H5N1 インフルエンザウイルス高感度検出系開発に向けた H5 HA 特異的抗体のエピトープ解析」第 61 回日本ウイルス学会学術集会、神戸、2013 年 11 月 11 日
- 4) 高橋仁、田中仁喜、西村研吾、高山郁代、中内美名、永田志保、小林美栄、藤博幸、大西和夫、横田(恒次)恭子、田代真人、影山努「H5 HA 特異的なモノクローナル抗体の作製と H5N1 インフルエンザ迅速診断法構築の検討」第 61 回日本ウイルス学会学術集会、神戸、2013 年 11 月 11 日

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

H5 亜型インフルエンザウイルスを特異的に認識するモノクローナル抗体

出願番号は、特願 2011-227748 (横田、大西、西村、東洋紡株式会社ら)

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人工ヌクレアーゼ TALEN を用いた miRNA 欠損マウスの作製を行った。

研究組織

- (1) 独立行政法人国立成育医療研究センター研究所
浅原 弘嗣、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) 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をも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 および Treg 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を組み合わせる解析を行い、Th17 細胞および Treg 細胞の分化および機能における分子ネットワークを推定した。

OA の病態に関わる miRNA の機能解析

① 軟骨細胞における miR-455 の強制発現

軟骨細胞に miR-455-5p および 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。

②ルシフェラーゼアッセイによる miR-455 の標的遺伝子の解析

HIF2 α 遺伝子の 3' UTR 領域をルシフェラーゼ遺伝子の下流に挿入したレポーターベクターを作製した。miR-455 の発現ベクターと共に HEK293T 細胞に遺伝子導入し、ルシフェラーゼ活性を測定した。

TALEN を用いた miRNA ノックアウトマウスの作製

miRNA のコード領域を標的とした TALEN ベクターを構築し、これを鋳型として mRNA を合成した。TALEN mRNA を DBF1 マウス受精卵の細胞質にマイクロインジェクションし、ノックアウトマウスの作製を行った。各マウスの genotype は PCR および DNA シークエンスにより確認した。

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 の発症に関わる 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 細胞および Treg 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- β 1、TGF- β 1 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-21 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。

一方で、Treg 細胞において高発現を示す miRNA として 7 個の miRNA を同定することができた。これらの中で miR-466f、miR-466q、miR-467f、miR-669h はファミリーを形成し、Sfmbt2 遺伝子のイントロンにクラスターとして 30 個以上コードされていることが明らかになった。また、これらの miRNA の標的遺伝子を標的予測ツールである TargetScan および miRanda を用いて解析したところ、IL-21、Bcl6、Rictor、IRF4、Hif1a 等が標的候補であることが明らかになった。

また、候補に挙がった miRNA を人工ヌクレアーゼである TALEN を用いて、ノックアウトマウスの作製を試みた。その結果、miR-146a および miR-146b のノックアウトマウスの作製に成功し、生殖系列への伝達も確認できた (図 1)。

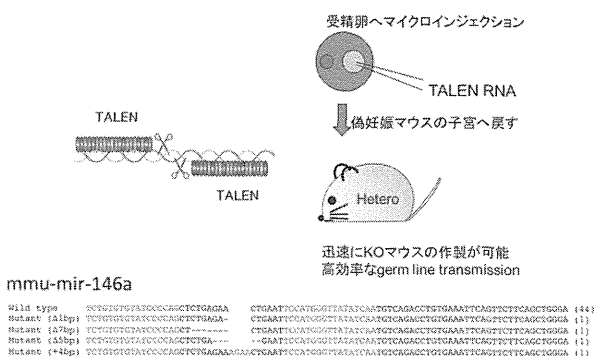


図1. TALENを用いたmiRNAノックアウトマウスの作製

0A 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 および 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 および 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 および 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、マイクロアレイ解析を行なった結果、miR-455-5p および miR-455-3p により発現が減少する遺伝子として、HIF2 α (EPAS1) 同定した。miR-455 による HIF2 α の発現抑制を確認するために、HIF2 α の 3' UTR をルシフェラーゼ遺伝子の下流に挿入したレポ