

② 脳脊髄液のメタボロミクス解析

統合失調症 30 名、双極性障害 16 名、大うつ病 30 名（これらの患者のうち、drug free 患者は、統合失調症 8 名、大うつ病 5 名、双極性障害 2 名）、健常者 30 名、合計 106 名に対して、CE-MS 法によるメタボロミクス解析を行った。

③カンナビノイド関連分子の検討

24 年度に統合失調症 76 名、双極性障害 30 名、大うつ病 96 名、気分変調症 8 名、健常者 70 名、その他 2 名の血漿サンプルを用いて EAP の測定を行った(合計 282 名)。25 年度は、新たに 216 検体について測定を追加したほか、採血後処理条件を厳密に統制した独立のサンプル(統合失調症 30 名、双極性障害 16 名、大うつ病 30 名、健常者 30 名=②と同じサンプル)を用いて測定を行った。血漿を限外ろ過法により除タンパク質処理し、陰イオン交換カラムによるイオンクロマトグラフィー蛍光検出法 (IC-FLD 法) にて濃度を測定した。

上記②で用いたサンプルで脳脊髄液中のカンナビノイド関連分子 C についても、HPLC を用いて測定した。

④うつ病の血漿中アミノ酸

アミノ酸は、神経伝達物質の原料になることもあり、精神疾患のバイオマーカーとなる可能性が指摘されている。われわれは、66 名の大うつ病患者と 82 名の健常者を対象として必須アミノ酸の 1 つトリプトファンに注目した解析を行った。さらに、過去の文献のメタアナリシスも行った。

⑤統合失調症の血中ベタイン関連分子

分担研究者の岩本らは、24 年度に HMT 社と共同で、統合失調症の血液においてベタインなどの分子について CE-MS 法による解析を行った。第

一サンプルは、初発統合失調症 18 名と健常者 14 名、第二サンプルは、初発統合失調症 24 名、広汎性発達障害 15 名、健常者 12 名であり、疾患特異性についても検討した。

25 年度には、ベタインが DNA メチル化経路に位置することに着目し、ベタイン量低下と DNA メチル化との関係を調べた。昨年度までにメタボローム解析を行った合計 25 サンプルの初発統合失調症患者、43 サンプルの健常者血液から抽出した DNA を対象とし、Pyrosequencing 法による総 DNA メチル化量の定量を行った。また、4 組の統合失調症患者一卵性双生児不一致例の血漿を用い、CE-MS 法によるメタボローム解析を行った。

(倫理面への配慮)

本研究では、精神疾患患者、健常対照群を対象とした臨床研究を行った。生体内分子に関するデータや臨床情報を用いた研究は、個人情報への漏えいなどの危険性があるため、臨床研究に関する倫理指針を遵守した研究計画書を作成し、倫理審査委員会において承認を受けた上で研究を行った。遺伝子解析研究は、文部科学省、厚生労働省、経済産業省告示第 1 号の「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」を遵守した研究計画書を作成し、倫理審査委員会において承認を受けた上で研究を行った。文書を用いた試料提供者への説明とインフォームド・コンセント、個人情報の厳重な管理 (匿名化) などを徹底している。

C.研究結果

①死後脳メタボロミクス解析

固定した脳切片からもメタボロミクス解析が可能であることを明らかにした。統合失調症の海馬と前頭葉で共通に変化しているメタボライトとして、ジペプチドの分子 A と糖鎖修飾分子 B が有力であることを見出した。分子 A は海馬におい

て多重比較を補正しても統合失調症で有意に上昇しており($p=0.00009$)、前頭葉でも有意に上昇していた($p=0.0045$)。分子 B は、海馬($p=0.01$)、前頭葉($p=0.00016$)で共に上昇していた。なお、特許出願の可能性があるため、これらの分子名を本報告書においては伏せた。

②脳脊髄液のメタボロミクス解析

89 分子測定し、全例測定できていたもの 53 分子、半数以上 73 分子、10 例以下のもの 11 分子であった。そのうち、診断間で有意差のあったものとして 5 分子、うつ病重症度と有意な相関を示したものの 4 分子、統合失調症重症度と有意な相関を示したものの 6 分子を同定した。特に、細胞保護作用をもつ分子 S は、うつ病の一部で突出して増加を示した。統合失調症の CSF 中で尿素(urea)が有意に低下していた($p=0.028$)。Drug free の患者でも低下しており($p=0.028$ 、偶然同じ p 値を得た)、薬物の影響とは考えにくい、健常者と顕著な差は見られなかった。また、ジペプチドの分子 H は、うつ病重症度(HAMD-21 で評価)と比較的強い相関を示した($R^2=0.46$)。さらに、カンナビノイド関連分子 C がうつ病で有意に低下していた($p=0.019$)。

③カンナビノイド関連分子

脳脊髄液中のカンナビノイド関連分子 C は、HPLC で測定しても CE-MS と殆ど同じ結果を示し、健常者と比較してうつ病患者において有意に低下していた($p=0.016$)。

EAP については、24 年度に統合失調症 76 名、双極性障害 30 名、大うつ病 96 名、気分変調症 8 名、健常者 70 名、その他 2 名の血漿サンプル(合計 282 名)を測定した結果、うつ病において有意な低下を認めなかった(追加サンプルも同様)。25 年度における血液採取後の処理を統制したサ

ンプル(統合失調症 30 名、双極性障害 16 名、大うつ病 30 名、健常者 30 名、合計 106 名)においても、うつ病において有意な低下はみられなかった。うつ病の一部のサブタイプとの関連についてさらに解析予定である。

④うつ病患者の血漿中トリプトファン

うつ病患者では、健常者に比べて血漿トリプトファン濃度が有意に低かった($p<0.05$)。過去の 24 研究とわれわれのデータを合わせてメタアナリシスを行ったところ(計 744 名のうつ病と 793 名の健常者)、うつ病患者は健常者と比較して、有意に低下していると結論された($P<0.000000001$)。

⑤統合失調症の血中ベタイン関連分子

総 DNA メチル化量の定量を行った結果、ベタイン量との有意な相関を認めた。

一方、4 組の統合失調症患者一卵性双生児血漿における測定では、4 組中 2 組の患者で健常者と比較しベタイン量の低下が認められたが、全体として統計的な有意差は認められなかった。

D. 考察

死後脳のメタボロミクス解析では、海馬と前頭葉で共に同じ方向に変化しており、多重比較で補正しても有意な変化を示した分子が見出され、病態の鍵分子、バイオマーカー候補であることが示唆された。分子 A、B 以外にも多数の候補分子を同定しており、統合失調症の病態解明や、バイオマーカーを開発する上で貴重なデータベースを構築した。

脳脊髄液のメタボロミクス解析では、診断間で有意差のあったものとして 5 分子、うつ病重症度と有意な相関を示したものの 4 分子、統合失調症重症度と有意な相関を示したものの 6 分子を同定した。これらは、バイオマーカー候補として有力である。特に、細胞保護効果が知られている分子 S は、う

うつ病の一部で突出して増加しており、バイオマーカー候補として最有力である。今後、サンプル数を増やして検討する価値がある。Urea は、統合失調症で低下していたが、脳脊髄液中への排出低下が病態と関連している可能性もあり、興味深い。しかし、平均値は低いものの、健常者と重なっており、バイオマーカーとして活用できるかどうか疑問である。また、分子 H のようにうつ病症状とよく相関する分子も見出され、これは **state marker** として有望である。

内因性カンナビノイド（大麻様物質）は、気分や情動の調節に深く関わっている。EAP については、うつ病での低下を支持する結果が得られなかったが、健康者、患者共に濃度範囲が広く、個人差を考慮した基準作りが必要であるかもしれない。今後、症状に基づいた類型との関連について解析する価値がある。一方、EAP と極めて近縁の分子である分子 C は、うつ病の脳脊髄液中で有意に低下していることを CE-MS 法と HPLC 法で一致して見出した。今後、サンプルを増やして検討する価値がある。

うつ病患者においてトリプトファンの濃度が低く、メタアナリシスでも確認した($p < 0.000001$)。以上から、血漿中トリプトファンはうつ病のバイオマーカーとなる。ただし、感受性や特異性はそれほど高くないため、その臨床的意義（状態依存性指標なのか素因指標なのか）について検討していく必要がある。

統合失調症の血液メタボライトに関する解析では、ベタイン濃度の減少が再現され、バイオマーカー候補として極めて有望であることが示唆された。鑑別が困難な統合失調症と自閉性障害との判別率も高いことから、臨床的有用性は高い。今後、投薬の影響や重症度との関連についても含め、大規模サンプルで検討する価値がある。また、ベタイン量と総 DNA メチル化量との有意な相関

が認められたことから、ベタインは細胞内エピジェネティクス環境の制御に関わっていると考えられた。また、ベタイン量の低下は 4 組の一卵性双生児不一致例のうち、2 組の患者側で認められたため、環境要因の影響により生じている可能性が考えられた。しかし、全体として有意差は認められなかった。これは現段階では測定症例数が少ないためである可能性が考えられ、今後サンプル数を追加し検討を行う必要がある。

本研究によってうつ病や統合失調症のバイオマーカーが実用化されれば、客観的診断が可能となるうえ、プライマリケア医や健康診断による早期発見も可能になる。早期治療によって、重症化を防ぐことができれば、休職や失業、入院患者数、自殺者の減少につながることを期待される。また、バイオマーカーの開発はコンパニオン診断薬としての活用が期待され、創薬にも大きく貢献することが期待できる。

E. 結論

統合失調症、うつ病の血液、死後脳、脳脊髄液のメタボライトの解析から、統合失調症のバイオマーカーとして、ベタイン（減少）やジペプチド分子 A（上昇）、糖鎖修飾分子 B（上昇）などが有用であることを明らかにした。ベタインは、メチル化を制御している可能性がある。うつ病では、脳脊髄液中のカンナビノイド関連分子 C（低下）や細胞保護作用のある分子 S（上昇）、血漿中のトリプトファン（低下）がバイオマーカーとして有用である可能性が示唆された。EAP については、うつ病のサブタイプとの関連についてさらに検討していく必要がある。

F. 研究発表

1. 論文発表

Koike S, Bundo M, Iwamoto K, Suga M,

Kuwabara H, Ohashi Y, Shinoda K, Takano Y, Iwashiro N, Satomura Y, Nagai T, Natsubori T, Tada M, Yamasue H, Kasai K: A snapshot of plasma metabolites in first-episode schizophrenia: A capillary electrophoresis time-of-flight mass spectrometry study. *Translational Psychiatry* (in press)

その他、総説的論文功刀ら 1 件、岩本ら 1 件

結果④については論文投稿中(in revision)。

2. 学会発表（功刀ら 5 件、岩本ら 4 件）

代表的な発表：

小池進介、岩本和也ほか：初回エピソード統合失調症における末梢血血漿成分のメタボロミクス解析．第 34 回日本生物学的精神医学会 2012 年 9 月

小川眞太朗、功刀浩ほか：うつ病における血漿中モノアミン関連遊離アミノ酸濃度に関する検討．第 16 回日本病態栄養学会、2013 年 1 月

功刀浩：うつ病の診断マーカー.第 36 回 日本分子生物学会、2013 年 12 月

岩本和也，精神疾患患者末梢血試料を用いたエピゲノム解析, 第 23 回日本臨床精神神経薬理学会・第 43 回日本神経精神薬理学会 (2013/10/24-26 沖縄)

G. 知的財産権の出願・登録状況

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

フラビウイルス粒子様ワクチンの開発

国立感染症研究所 感染病理部
長谷川 秀樹

平成24年4月～平成26年3月

研究要旨 ワクチンも無く治療薬も無い DENV に焦点を絞って、「表面はウイルス粒子と同等の抗原性で内部にゲノムを持たない非感染性キメラ DEN-VLP」抗原開発を、研究組織の微研会・JNC と連携して有機的に進めた。その結果、計画通り或いは計画以上の進捗が得られ、加えて、学術的にも興味深い新知見が得られた。

研究組織

- (1) 国立感染症研究所感染病理部 長谷川秀樹、
小島朝人、鈴木忠樹、飛梅 実
- (2) 武蔵村山病院 高橋秀宗
- (3) 阪大微生物病研究会 五味康行
- (4) JNC株式会社 畠山昌和

A. 研究目的

デングウイルス (DENV)、日本脳炎ウイルス (JEV)、ウエストナイルウイルス (WNV) によるフラビウイルス感染症は、何れも吸血した感染蚊が媒介する重篤な疾病で、東南アジア、北・南米大陸、カリブ諸島では毎年流行を繰り返し、その規模も地域も拡大している。地球温暖化に伴い日本でも再燃あるいは侵襲が懸念されている。しかし、ワクチン以外に対処法はない。

このような状況下で、研究組織の微研会により組織培養新不活化 JE ワクチンが世界に先駆けて開発 (2009 年 2 月認可) され、細胞培養不活化 WN ワクチンも開発されつつある。

そこで、①ワクチンも無く治療薬も無い DENV に焦点を絞り、②デング熱で重篤化の原因となる感染増強抗体を誘導しない/誘導活性の低い DENV キメラ粒子抗原をデザインし、③官民共同研究の成果「表面はウイルスと同等の抗原性で内部にウイルスゲノムを持たない非感染性ウイルス様粒子 (VLP) 産生の独自技術」(特許第 4268384 号、特許第 5027106 号、特許第 5448836 号) を駆使して、④感染性ウイルスもその封じ込め施設も不要な、それ故安全/安価な理想の DEN-VLP ワクチンを、⑤微研会のウイルス抗原・抗体、JNC のカラム精製法とも有機的に連携して、フラビウイルス粒子様抗原に開発研究することを目的とした。

B. 研究方法

研究組織の国立感染症研究所 (長谷川、小島、鈴木、飛梅、高橋)、及び、阪大微生物病研究会 (五味)、JNC 株式会社 (畠山) は其々の得意とする専門分野を有機的に連携あるいは分担して官民共同研究を推進した。即ち、五味らはフラビウイルス抗原・フラビウイルス特異的モノクローナル抗体の調整を感染研と連携して行い、畠山らは VLP 抗原の精製について Cellufine sulfate アフィニティーカラム法を中心とした検討を感染研と共同で実施した。感染研は、①DENV E 蛋白質の主要中和ドメイン発現ベクターの構築、②DENV 感染増強抗体誘導に強く関与する prM 或いは E 蛋白質非中和ドメインを他のフラビウイルスの相当領域と置換させたキメラ prM-E 蛋白質のデザイン、③それらを発現する種々のキメラ prM-E cDNA の合成、④一過性発現系で細胞外に放出される DENV 抗原の性状解析、を実施した。

(倫理面への配慮)

本研究において動物実験を実施する場合は、「研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針」(文部科学省告示第 71 号、平成 18 年 6 月 1 日)に基づき、各機関における動物実験委員会の承認を受けて行うこととする。

C. 研究結果

本研究事業の2年間においては、ワクチンも無く治療薬も無い DENV に焦点を絞って、研究組織の微研会・JNC と連携して研究開発を有機的に進めた。その結果、計画通り或いは計画以上の進捗が得られた。具体的には、

- (1) 増殖が悪く調整が困難とされる DENV は、感染研分離株 (ウイルス 1 部) を親株にして Vero 細胞で増殖させ、動物実験にも使用可能な 4 種の血清型ウイルスを調製した。増殖性の低い

DENV3 型は Vero 細胞で 7 代継代を繰返してウイルス価を達成した。これら DENV1~4 株を用いてワクチン評価モデルを目指した動物実験に着手している。

- (2) DENV1~4 型について、ウイルス価を定量する plaque assay 法・focus assay 法を確立した。
- (3) 単クローン抗体を組合せて、DENV1~4 型の E 及び prM 蛋白質を定量できる DENV 抗原サンドイッチ ELISA 法を樹立した。この ELISA 法は抗原蛋白質に加えて、感染性 DENV 1~4 型粒子も感度良く検出できる事を見出した。
- (4) WN-VLP 及び WNV の精製に有用である研究組織 JNC の Cellufine Sulfate カラム法(J Virol Methods 174:131-5, 2011. 微研会・JNC と共著)は、DENV においても効率の良い精製法になることが示唆された。
- (5) DENV の主要中和ドメインを効率よく発現するフラビウイルス粒子様抗原を開発するため、表面蛋白質領域を種々にデザインしたキメラ cDNA をコドン最適化合成した。これら発現ベクターのトランスフェクションによる一過性発現系を用いて、下記のようなフラビウイルスキメラ粒子形成に関する新たな興味深い知見が得られた。

- ① DEN-VLP 発現ベクターから細胞外に分泌される DENV 抗原では蛋白質間が相互に連携していた。
- ② 表面蛋白質の相互連携には蛋白質のドメインが関与していることが示唆された。
- ③ DENV の発現・分泌に対して異種フラビウイルスのシグナル配列でも有効に作用する事が示された。
- ④ DENV ドメインは異種フラビウイルスの相当ドメインと置換可能であった。
- ⑤ DENV の蛋白質は異種フラビウイルスベクターのバックグラウンド下でも発現可能である事を示した。
- ⑥ DENV の発現で細胞外に分泌される抗原は、蔗糖密度勾配遠心で 2 方性のピークを示すのに対して、あるドメインのみが DENV に由来するものでは単一のピークを形成した。

D. 考察

上記結果の項に示されたように、フラビウイルス様キメラ粒子ワクチンを開発する試みは計画を超えて進展しており、加えて、本研究は学術的にも興味深い新知見を与えている。

しかしながら、免疫実験において究極の目的とした感染増強抗体を「誘導せず」或いは「低レベルで

ある」粒子抗原開発に到達するには幾つかのクリアすべき壁が待ち構えている。即ち、DENV の主要中和ドメインをキメラ粒子様抗原に構築できたか否か正確に判定するためには、WNV, DENV 1~4 及び WNV の各ドメイン I/II, III それぞれを識別できる単クローン抗体が必要になろう。しかし、世界中で開発が旺盛に進められているものの、完成には遠い。また、JNC が精力的に進めているカラム精製法の完成も必須である。そのためには、培養上清からの VLP 抗原精製効率を著しく阻害する牛胎児血清を用いない無血清での発現培養系の開発も必須である。現在、複数の無血清培養系を調査し、有望な系を確認中である。

このような解析基盤の一つ一つを着実に確立して、解析の幅をさらに厚くすることにより、本研究で発現が示唆された各種キメラ粒子抗原の有用性を示していく必要がある。即ち、電子顕微鏡観察等による形態・構造の異同と、中和ドメインの粒子表面発現分布の濃淡と、動物の免疫応答における中和抗体価/感染増強抗体価の高低の相関を明らかにするという、フラビウイルス粒子様ワクチン開発研究の次なる路が拓けて来よう。今後課せられた命題として研究を継続し、出願可能な新世代ワクチンにまで高めていく予定である。

E. 結論

ワクチンも治療薬も無い、我国への侵入が危惧される DENV に焦点を絞って、「表面はウイルス粒子と同等の抗原性で内部にゲノムを持たない非感染性 VLP」を、JEV・WNV の VLP 研究で培ってきた我々の新技術[特許第 4268384 号、特許第 5027106 号]で構築し、特殊な封じ込め施設は不要で安全/安価な製造を担保するフラビウイルス粒子様ワクチン抗原に開発することを、官民が連携した共同研究で推進した。

初年度には DENV の馴化/増殖法、感染価測定系、抗原・抗体 ELISA 等の各種アッセイ法を確立・樹立した。これらを基盤に、感染増強 prM 抗体誘導の無/低い DENV キメラ粒子抗原をデザインし、キメラ cDNA を合成して発現ベクターを構築した。この発現系で、DENV 抗原の細胞外分泌に蛋白質のドメインが関与したタンパクとの相互連携を示唆し、ある蛋白質の膜貫通ドメイン・またシグナル配列は異種フラビウイルスの相当部位で代替可能であることも示した。その結果、DENV の主要中和ドメインは異種フラビウイルスバックグラウンド下で発現可能になり、蔗糖密度勾配遠心で DENV と異なる分画パターンを示した。

以上、本研究は計画通り或いは計画以上に進捗し、且つ、学術的に興味深い新知見も得た。

F. 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.

Nagakawa K, Niikura K, Suzuki T, Matsuo Y, Igarashi M, Sawa H, Ijiro K. Virus Capsid Coating of Gold Nanoparticles via Cysteine- Au Interactions and Their Effective Cellular Uptakes. Chemistry Letters 2012 Jan;41(1):113-115.

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. 2013 May 28;7(5): 3926-38.

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.

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

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

G. 知的財産権の出願・登録状況

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)

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
平成24年4月～平成26年3月

研究要旨：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。LC16m8 ワクチン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。これほど長期にわたり細胞培養弱毒生痘そうワクチンワクチン製剤の安定性・有効性について評価された研究はなく、本研究班で得られた研究成績は、天然痘ワクチンの備蓄に対する重要な知見となる。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（河北総合病院，H24年度のみ）

藤井達也

- 5) 自衛隊中央病院診療科（H25年度のみ）
阿部信次郎
- 6) 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。本研究において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、96 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。平成 21 年度から長期保管における安定性評価項目として導入した、マウス神経毒力試験及び中型プラーク含有率測定試験についても評価した。

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。

斉藤らが報告 (JAMA, 2008) した LC16m8 株接種の臨床試験のうち、第 2 ラウンドの被験者 (200 名) の血清を対象とした。善感反応を示さなかった 4 検体を除く 196 検体をプロテインアレイに供し測定を行った。血清は接種前、接種後 1 ヶ月目に採取し、ペア血清として解析を行った。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との比較を行った。

5) 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致死性サル痘発症予防効果に関する研究。

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。

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。

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 I/II 相臨床試験成績を再解析した。

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。

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) 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) LC16m8 株の親株と考えられるワクチ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チ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。

- 10) 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 48:268-276, 2010)。

【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。

化血研製造ロット (V03, V04 及び V06) の長期保存安定性試験において、保管後、96 箇月目の検体について試験を実施した結果、ボックス形成法及びプラーク形成法による力価試験の成績では、明らかな力価の変化は認められなかった。また、含湿度試験の成績でも明らかな変化は認められなかった。マウス神経毒力試験、中型プラーク含有率測定試験、その他の規格試験結果もいずれも適合であった。

- 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

初種痘群及び再種痘群の中和抗体陽性率はそれぞれ、LC16m8 ワクチン接種前では 0%(0/4) 及び 100%(13/13)、接種後 1 ヶ月後では 20%(1/5) 及び 87%(13/15)、4 ヶ月後では 100%(4/4) 及び 92%(11/12)、約 4 年後では 60%(3/5) 及び 93%(14/15) であった。初種痘群で約 4 年後に求められた抗体陽性率の低下傾向を検証するために、新たに 19 名の初種痘者を追加して約 4 年後の抗体陽性率を評価した結果、抗体陽性率は 58%(14/24) であった。

- 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。

Dryvax 接種血清では、蛍光強度の高い抗原は、初接種群において WR148, D13, I1, H3、再接種群においては、D13, WR148, A27, I1, H3 であった。LC16m8 株接種の日本人集団と Dryvax 株接種のアメリカ人集団において抗原性の共通性の高さが認められた。抗 B5 抗体は、LC16m8 接種血清で少なかった。

- 5) 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発症予防効果に関する研究.

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。

LC16m8 接種から霊長類においてサル痘発症予防効果を誘導されるまでの日数について解析した。ワクチン接種 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。

- 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.

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、ワクチン株に関係なく陽転率低下の可能性が示唆された。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。

- 7) 劇症型サル痘発症機序の解明に関する研究.

劇症型サル痘個体では、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。

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(図 11)。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) 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、LC16mO, m8 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。

- 9) LC16m8 株の親株と考えられるワクチ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。

- 10) 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パンドが得られた。現在、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

- 1) 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。

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 か月）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 箇月目まで有効成分等に変化が認められず、安定であることが示された。H25 年度はさらに継続して評価を行い、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。

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。

2) LC16m8 株の有効性に関する研究（霊長類感染モデル）。

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。

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, 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.

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, 特に骨髓低形成による好中球低下症に関連していると推察している. 今後の検討課題として, 好中球の皮膚発疹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. 次いで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疹形成はみられず, 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.

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

A) 天然痘ワクチンによる副作用の文献的調査

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.

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。

B) LC16m8 の有効性と安全性に関する研究

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 (図 8)。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 ヶ月後に最高値となり約 4 年後には 1 ヶ月後と同等の値となる推移を示した (図 9)。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。

C) ワクチニアウイルスの各抗原に対する抗体反応評価による LC16m8 の有効性に関する研究

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、プロテオミックス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。

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。

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。

5) 既知・未知のポックスウイルスを迅速に検出する方法の検討と開発

近年、次世代シーケンサーを中心にメタゲノム解析の技術が進み、新規ウイルスの発見が容易になった。次世代シーケンサーでは DNA をランダムに切断して塩基配列を読むという手法を採用している場合が多いので、サンプル中にヒトや動物の DNA が含まれていると、短いゲノムを持つウイルスは検出されにくいことになる。ウイルス感染により症状があらわれている場合には、体内におけるウイルス量も多いと考えられるので、次世代シーケンサーによる解析に適した材料と考えられる。しかし、潜伏感染や不顕性感染などを起こしているウイルスに対しては、ウイルス量が極めて少ないと考えられるので、適した材料とはならない。このような場合には、PCR による検出が適している。

PCR は特定の遺伝子を 2 つのプライマーを用いて増幅する優れた技術であるが、塩基配列が明らかになっていないと、プライマーをデザインできない。すなわち、新規ウイルスの検出には用いることができない。一般に、ウイルスは細菌のリボゾーマル RNA のような共通配列を持っていない。しかし、ウイルス属やウイルス科に共通な配列は存在するので、このような配列を利用して特定のウイルス科 (属) を広く検出する手法が用いられている。

E. 結論

細胞培養弱毒生痘そうワクチン LC16m8 の遺伝的安定性、動物実験における有効性と副作用 (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。

細胞培養弱毒生痘そうワクチン LC16m8 製剤の長期保管による品質の変化の出現を、10 年を超える経過で定期的に評価した。10 年を超える保管によっても、細胞培養弱毒生痘そうワクチン LC16m8 製剤の品質において以上が生じていないことが明らかにされた。このような研究は世界的にみてもなく、天然痘ワクチンの保管において貴重なデータを提供する。

霊長類において LC16me 接種は致死性サル痘の発症を強力に抑制することが明らかにされた。ワクチン接種 3 日目にはその効果が認められ、7-14 日目には最も強く発症を抑制した。細胞培養弱毒生痘そうワクチン LC16m8 は天然痘発症抑制に有効であると考えられる。ヒトに細胞培養弱毒生痘そうワクチン LC16m8 を接種し、接種後の中和抗体価の推移、ワクチニアウイルスの各タンパク質 (特に EEV 関連抗原、IMV 関連抗原等) に対する抗体反応も解析した。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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

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-naïve 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)
- 11) 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

平成24年4月～平成26年3月

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。マウスにrBCG-SOCS1DNを免疫したところ結核抗原特異的サイトカインにおいて親株以上の産生が認められた。また、ワクチン効果は親株以上に長期間持続した。

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

GMPレベルでrBCG-SOCS1DNを作製し、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)

A. 研究目的

生体は過剰な免疫反応を抑制するメカニズムとしてサイトカイン抑制分子 (SOCS) を活性化させる。結核菌は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。さらにこの機構は結核菌ワクチンであるBCGも備えており、このSOCSの活性化を抑制すればBCGのワクチン効果を増大できる可能性がある。本研究ではBCGにSOCS1のアンタゴニスト分子を発現させ、現行のBCGのSOCSによるワクチン効果抑制機能を除去し、ワクチン効果を増強した新たなBCGワクチンを開発することを目的とした。

rBCG-SOCS1DN接種による遺伝子発現変異をマイクロアレイにて検討した。

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。また、自然免疫系細胞ではNOおよびG-CSFの誘導がrBCG-SOCS1DN免疫では親株BCGに比較し高いことが示された。

(松尾和浩)

rBCG-SOCS1DNは強毒結核菌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。さらにこの効果は親株に比較し、長期に維持されることが確認された。

(松本壮吉)

B. 研究方法

1 (保富康宏)

rBCG-SOCS1DNのin vivoでの増殖性と免疫誘導効果を検討した。また、自然免疫に対する働きを同様に検討した。

(松尾和浩)

rBCG-SOCS1DN免疫では親株BCGに比較し、抗体

誘導は低く、ワクチン効果の主体は細胞性免疫であることが示唆された。

(梅村正幸)

マイクロアレイによる免疫マウスの免疫系の遺伝子発現変異を調べたところ、炎症関連遺伝子、接着関連遺伝子、細胞遊走性関連遺伝子、細部障害性関連遺伝子において親株BCGに比較し有意に発現増強するものが多数認められた。

D. 考察

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。

BCGのワクチン効果は小児の粟粒結核や結核性髄膜炎等においては非常に効果的に認められるが、成人の肺結核においては明確な防御効果は議論の対象となっている。南アフリカにおける疫学調査ではBCGの効果は10歳令前後で最も明確な抑制効果が認められ、その後は肺結核発病者は増加し、17歳以上ではBCG非投与と有意な差が見られないとされている。本研究で用いたrBCG-SOCS1DNは自然免疫のみでも排除される弱毒性にもかかわらず、ワクチン効果が長期間認められる。このことは現在のBCGの問題である、成人での効果が期待でき、さらに自然免疫を刺激すること、弱毒化を示すことから新生児接種BCGとしては理想的と考えられる。現在、マウスから霊長類にモデルを移行し検討を開始したので、本ワクチン効果のさらなる検討を行う予定である。

E. 結論

rBCG-SOCS1DNは現行のBCG以上に安全性が高く、効果が持続する結核ワクチンになりうる可能性が示された。

F. 研究発表

1. 論文発表

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) 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.

3) 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

4) 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.

5) 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.

6) 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.

7) Yoshida T, Omatsu T, Saito A, Katakai Y, Iwasaki Y, Kurosawa T, Hamano M, Higashino A, Nakamura S, Takasaki T, Yasutomi Y, Kuran I, Akari H. Dynamics of cellular immune responses in the acute phase of dengue virus infection.

Arch Virol. 2013;158:1209-20.

8) 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. 2013 Jan 4;9(2).

9) 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 J, 5:56-65.

10) Yoshida, T., Omatsu, T., Saito, A., Katakai, Y., Iwasaki, Y., Iijima, S., Kurosawa, T., Hamano, M., Nakamura, S., Takasaki, T., Yasutomi, Y., Kuran 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.

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

12) Uchida, A., Sasaguri, H., Kimura, N., Tajiri, M., Ohkubo, T., Ono, F., Sakaue, F., Kanai, K., Hirai, T.,

Sano, T., Shibuya, K., Kobayashi, M., Yamamoto, M., Yokota, S., Kubodera, T., Tomori, M., Sakaki, K., Enomoto, M., Hirai, Y., Kumagai, J., Yasutomi, Y., Mochizuki, H., Kuwabara, S., Uchihara, T., Mizusawa, H. and Yokota, T. Non-human primate model of ALS with cytoplasmic mislocalization of TDP-43. *Brain* 2012;135;833-846.

13) Saito, A., Kono, K., Nomaguchi, M., Yasutomi, Y., Adachi, A., Shioda, T., Akari, H. and Nakayama, E. E. Geographical genetic and functional diversity of antiretroviral host factor TRIMCyp in cynomolgus macaque (*Macaca fascicularis*). *J. Gen. Virol.* 2012;93:594-602.

14) Higashino, A., Sakate, R., Kameoka, Y., Takahashi, I., Hirata, M., Tanuma, R., Masui, T., Yasutomi, Y. and Osada, N. Whole-genome sequencing and analysis of the Malaysian cynomolgus macaque (*Macaca fascicularis*) genome. *Genome Biol.* 2012 Epub

15) Tachibana, S., Sullivan, S.A., Kawai, S., Nakamura, S., Goto, N., Arisue, N., Palacpac, N.M.Q., Honma, H., Yagi, M., Tougan, T., Katakai, Y., Kaneko, O., Mita, T., Kita, K., Yasutomi, Y., Kim, H.R., Sutton, P.L., Shakhbatyan, R., Horii, T., Yasunaga, T., Bamwell, J.W., Escalante, A.A., Carlton, J.M. and Tanabe, K. *Plasmodium cynomolgi* genome sequences provide insight into *Plasmodium vivax* and the monkey malaria clade. *Nature Genetics* 2012;44:1051-1055.10)

16) 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 BCGprime-recombinant vaccinia virus boost protocol. *Vaccine* 31:3549-57 (2013)

17) Karamatsu K, Matsuo K, Inada H, Tsujimu

- ra Y, Shiogama Y, Matsubara A, Kawano M, Yasutomi Y. Single systemic administration of Ag85B of mycobacteria DNA inhibits allergic airway inflammation in a mouse model of asthma. *J. Asthma and Allergy* 2012;5, 71-79 (2012)
- 18) Nishiuchi, Y., Tamaru, A., Suzuki, Y., Kitada, S., Maekura, R., Tateishi, Y., Niki, M., Ogura, H., and Matsumoto, S. 2013. Direct detection of *Mycobacterium avium* in environmental water and scale samples by loop-mediated isothermal amplification. *J Water Health*, in press.
- 19) 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.
- 20) Yamashita, Y., Y. Hoshino, M. Oka, S. Matsumoto, H. Ariga, H. Nagai, M. Makino, K. Ariyoshi, and Y. Tsunetsugu-Yokota. 2013. Multi color Flow Cytometric Analyses of CD4(+) T Cell Responses to *Mycobacterium tuberculosis*-Related Latent Antigens. *Jpn J Infect Dis* 66:207-215.
- 21) 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.
- 22) 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.
- 23) 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.
- 24) 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.
- 25) 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.
- 26) 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.
- 27) 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.
- 28) 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