

201318080A

厚生労働科学研究費補助金
新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業
課題番号 (H25-新興-一般-019)

粘膜免疫誘導型新規結核ワクチンの開発

平成25年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 保富 康宏
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

平成26年(2014)年3月

目 次

I. 総括研究報告

粘膜免疫誘導型新規結核ワクチンの開発

保富 康宏 ----- 1

II. 分担研究報告

1. ワクチン効果の判定と解析

保富 康宏 ----- 4

2. 結核菌抗原遺伝子組み込みパラインフルエンザ2型ウイルスの作製

野阪 哲哉 ----- 9

3. パラインフルエンザ2型ウイルス感染状況に関する研究

庵原 俊昭 ----- 12

4. ワクチンベクターに対する自然免疫応答の解析および安全性の検討

石井 健 ----- 16

5. 結核ワクチンにおける粘膜免疫応答の解析

國澤 純 ----- 20

6. パラインフルエンザ2型ウイルスベクターの病理学的安全性に関する研究

伊奈田 宏康 ----- 28

7. 遺伝子導入細胞の作製とウイルス増殖性の検討

松尾 和浩 ----- 31

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 37

IV. 研究成果の刊行物・別刷 ----- 47

厚生労働科学研究費 新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業
総括研究報告書

医科学研究に重要な霊長類資源の繁殖・育成と疾患モデルの作製・解析

研究代表者 保富康宏 医薬基盤研究所 霊長類医科学研究センター センター長

結核ワクチンである BCG は成人の肺結核に対しては明確な予防効果は認められない。本研究ではパラインフルエンザ 2 型ウイルス (HPIV2) に結核抗原を組み込んだ新たな粘膜免疫誘導型結核ワクチンの開発を試みた。HPIV2 に結核菌分泌抗原 Ag85B 遺伝子を組み込んだ結核菌に対する組み換えワクチンを作製したところ、経鼻投与で肺結核を優位に抑制することが示され、BCG 感作ではさらに効果が増強されることも確認された。また、新たな結核抗原 (ESAT-6、Rv1733、Rv2626、Rpf D) を組み込んだ HPIV2 を HN 遺伝子欠損、V 遺伝子欠損 HPIV2 作製した。生体内における毒性評価試験として HPIV2 ワクチン経鼻投与カニクイザルの鼻粘膜の病理組織学的解析を行い、組織学的変化を確認した。この毒性評価を、マウスを用いて内因性アジュバント効果とその作用機序の解析を開始し、HPIV2 の V 遺伝子を用い、V 遺伝子と自然免疫抑制機能を検討する実験系を確立した。さらに粘膜リンパ組織依存的 IgA 抗体高産生細胞の同定や樹状細胞を介した粘膜リンパ組織形成など、HPIV2 システムの機能解析と安全性評価につながる新規知見を得ることが出来た。また、ヒトでの HPIV2 感染における疫学調査のために呼吸器症状を呈した小児から鼻汁・咽頭ぬぐい液を採取、保存を開始し、一部は測定した。さらに、臨床ウイルス学的解析も可能な体制を整え、HPIV2 特異抗体の測定のため、小児から成人に及ぶ健常者の保存血清準備を開始した。

研究分担者

野阪 哲哉 三重大学大学院医学系研究科感染症制御医学・分子遺伝学分野 教授
庵原 俊昭 (独) 国立病院機構三重病院 院長
石井 健 医薬基盤研究所アジュバント開発プロジェクト プロジェクトリーダー
國澤 純 医薬基盤研究所ワクチンマテリアルプロジェクトプロジェクトリーダー
伊奈田 宏康 鈴鹿医療科学大学・薬学部・病理学研究室 教授
松尾 和浩 日本 BCG 製造 (株) 日本 BCG 研究所 研究開発部 部長

A. 研究目的

新規の結核患者は世界中で毎年 800 万人発生しており、唯一のワクチンである BCG は、小児の結核性髄膜炎並びに粟粒結核に対しては防御効果を示すが、成人の肺結核に対して明確な予防効果は認められない。これらのことから、新規ワクチン開発は急務である。粘膜より感染を示す病原体には、感染時の粘膜での免疫反応が感染防御等に重要であり、この粘膜免疫を誘導す

るためには抗原を適切に粘膜面に投与しなければならない。つまり、肺結核の防御には適切な手法を用いてワクチン抗原を粘膜面へ投与することが重要である。本研究ではパラインフルエンザ 2 型ウイルス (HPIV2) に結核抗原を組み込んだ新たな粘膜免疫誘導型結核ワクチンの開発を目的とした。

B. 研究方法

分担報告書参照

C. 研究結果

- 1) 非複製型 rHPIV2-Ag85B を用いた系では結核に対し有効な免疫反応が誘導されることが確認された (Vaccine 2014)
- 2) BCG 感作ではワクチン効果がより増強されることも判明した。
- 3) 組換えウイルスワクチン作製のためのコンストラクト(pPIV2 Δ V、pPIV2 Δ V (EGFP)、pPIV2 Δ V(Ag85B)、pPIV2 Δ V(E1726D)、pPIV2 Δ HN、pPIV2 Δ HN(EGFP)、pPIV2 Δ HN(Ag85B)、pPIV2 Δ HN(E1726D))を作製した。
- 4) ワクチン用リコンビナントウイルス [HPIV2 Δ V、HPIV2 Δ V (EGFP)、HPIV2 Δ V(Ag85B)]および HPIV2 Δ HN(EGFP)、HPIV2 Δ HN(Ag85B)を作製した。
- 5) PIV2 Δ V 系ウイルス作製のための必要な構成的 V 蛋白発現 BSRT7/5 細胞を作製した。
- 6) 呼吸器症状を呈して当院を受診した小児から鼻汁・咽頭ぬぐい液を採取、保存を開始し、一部は想定した
- 7) クリニカルデータシートを作成し、臨床ウイルス学的解析も可能な体制を整えた。
- 8) HPIV2 特異抗体の測定のため、小児から成人に及ぶ健常者の保存血清準備を開始した。
- 9) rHPIV2の内因性アジュバント効果とその作用機序の解析を開始し、hPIV2のV遺伝子を用い、V遺伝子と自然免疫抑制能を検討する実験系を確立した。
- 10) ワクチン発現 HPV の調整、投与に関する技術導入を行うと共に、HPV の経鼻ワクチンベクターとしての機能解析と安全性評価につながる基礎的研究を遂行した。
- 11) 粘膜リンパ組織依存的 IgA 抗体高産生細胞の同定や樹状細胞を介した粘膜リ

ンパ組織形成など、HPIV2 システムの機能解析と安全性評価につながる新規知見を得ることが出来た。

- 12) 鼻粘膜周囲の骨組織を脱灰処理をせず染色可能か検討し、実現可能となった。
- 13) 経鼻投与によるカニクイザルの鼻粘膜について、投与後 6 時間、12 時間、24 時間での病理組織学的解析を行った。
- 14) HPIV2 の V または HN 遺伝子発現ベクターをそれぞれ導入し、それぞれの遺伝子導入 Vero 細胞のクローニングを行い、20 個ずつの候補株を得た。

D. 考 察

結核は世界 3 大感染症の中でも空気感染により伝播することから最もワクチンの必要な感染症と考えられている。呼吸器粘膜より感染を示す本疾患に関しては呼吸器粘膜に免疫反応を誘導する粘膜免疫誘導型ワクチンが感染防御に効果的であると考えられる。現在までに結核ワクチンにおいてはヒト治験が 7 件行われているが、その中で粘膜免疫誘導型ワクチンはない。本研究では HPIV2 をベクターとした粘膜免疫誘導型経鼻投与ワクチンであり、世界的にもその効果は期待されるものと思われる。

新規のワクチン特に組み換えウイルスワクチン等の新規技術を用いたワクチンでは効果の証明 (POC: proof of concept) のみならず、病原性の検討、自然界でのベクターウイルスの蔓延状況等、実用化に向けて必要な知見が数多く要求される。本研究ではそれらも踏まえ、広く知見を収集し実用化に向けて取り組んでおり、それらを踏まえ実用化への歩みを加速させていきたいと考えている。

E. 結 論

HPIV2 ベクターを用いた結核ワクチンの開発に向けて多様な知見が得られた。

F. 研究発表

分担研究報告書参照

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

なし。

ワクチン効果の判定と解析

研究分担者：保富康宏 医薬基盤研究所 霊長類医科学研究センター センター長

結核ワクチンである BCG は成人の肺結核に対して明確な予防効果は認められない。粘膜より感染を示す病原体には、感染時の粘膜での免疫反応が感染防御等に重要であり、この粘膜免疫を誘導するためには抗原を適切に粘膜面に投与しなければならない。本研究ではパラインフルエンザ 2 型ウイルス (HPIV2) に結核抗原を組み込んだ新たな粘膜免疫誘導型結核ワクチンの開発を試みた。HPIV2 に結核菌分泌抗原 Ag85B 遺伝子を組み込んだ結核菌に対する組み換えワクチンを作製したところ、経鼻投与で肺結核を優位に抑制することが示された。また、HPIV2 ベクターには RIG-I を介する自然免疫誘導によるアジュバント効果も存在することが確認された。以上の事から HPIV2 を用いた経鼻結核ワクチンは新たなワクチンとなり得る可能性が示された。

A. 研究目的

新規の結核患者は世界中で毎年 800 万人発生しており、唯一のワクチンである BCG は、小児の結核性髄膜炎並びに粟粒結核に対しては防御効果を示すが、成人の肺結核に対して明確な予防効果は認められない。これらのことから、新規ワクチン開発は急務である。粘膜より感染を示す病原体には、感染時の粘膜での免疫反応が感染防御等に重要であり、この粘膜免疫を誘導するためには抗原を適切に粘膜面に投与しなければならない。つまり、肺結核の防御には適切な手法を用いてワクチン抗原を粘膜面へ投与することが重要である。本研究ではパラインフルエンザ 2 型ウイルス (HPIV2) に結核抗原を組み込んだ新たな粘膜免疫誘導型結核ワクチンの開発を目的とした。

B. 研究方法

1. 挿入抗原 Ag85B の確認：リバーシジェネティックス法にて作製した抗酸菌分泌抗原 Ag85B 組み込み HPIV2

(rHPIV2-Ag85B) を Vero 細胞に感染させ、Ag85B と NP タンパクおよび mRNA

の発現を確認した。

2. 感染防御試験：rHPIV2-Ag85B を経鼻投与にてマウスに 2 週間隔 2 ないし 4 回投与した。2 回投与群では Ag85B DNA ワクチンを筋肉内に 2 回投与した。対象には BCG を用いた。投与後、強病原性結核菌 Kurono 株を噴霧感染させ、8 週後の肺および脾臓内の結核菌を測定した (Fig. 1)。

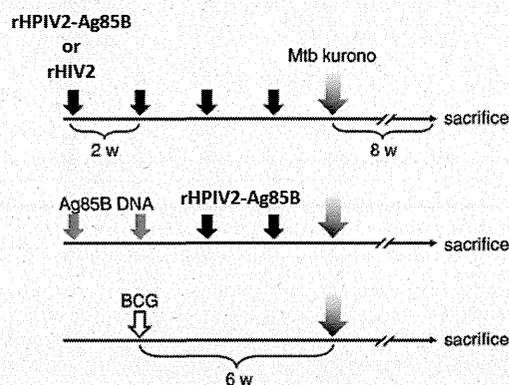
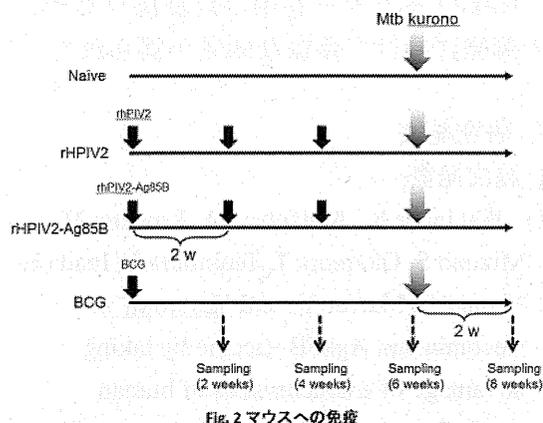


Fig. 1 マウスへの免疫

3. Ag85B 特異的免疫の誘導：上記免疫スケジュールでのマウスのマウス脾臓、肺リンパ節および肺胞洗浄液を用いた Ag85B 特異的 IFN- γ 細胞を ELISPOT にて測定した。

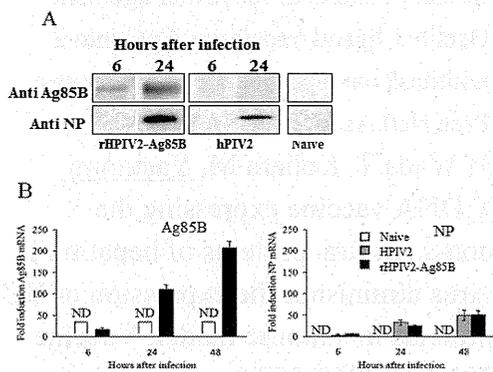
4. 結核菌特異的粘膜免疫の誘導：

rHPIV2-Ag85B を 2 週間隔で 3 回投与し、強病原性結核菌 Kurono 株を噴霧感染後に肺リンパ節細胞および肺胞洗浄液中の CD4⁺IFN- γ 陽性細胞を Facs にて調べた (Fig. 2)。



C. 研究結果

1. 挿入抗原 Ag85B の確認: 挿入抗原である Ag85B はウイルス抗原である NP の発現が確認されない感染後 6 時間で細胞に発現が認められた。また、Ag85B mRNA の発現も NP より早く、また 4 倍以上の量が認められた (Fig. 3)。



2. 高病原性結核菌に対する感染防御効果: 脾臓における結核菌は rHPIV2-Ag85B 4 回経鼻投与マウスでわずかであるが有意な抑制効果が認められたが、rHPIV2-Ag85B 2 回、Ag85B DNA ワクチン 2 回投与群と BCG 群に有意な差は認められなかった。しかしながら、肺では rHPIV2-Ag85B は他の群に比べ著しく感

染防御効果が認められた (Fig. 4)。

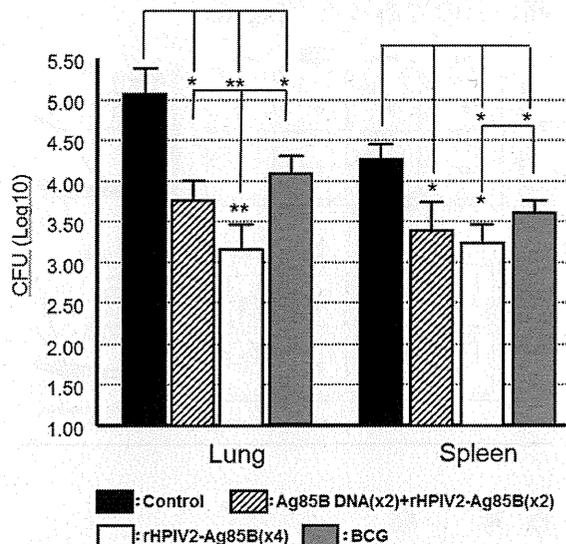
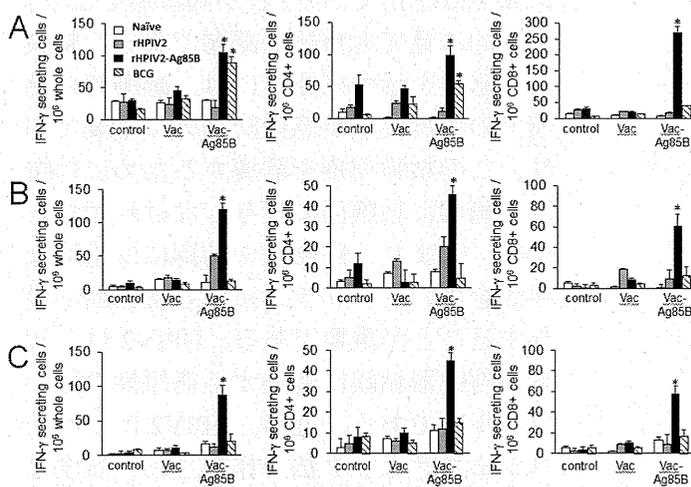


Fig. 4 免疫マウスにおける脾臓および肺における病原性結核菌の抑制効果

3. Ag85B 特異的免疫の誘導: 免疫マウスにおいて Ag85B 特異的免疫反応は脾臓、肺リンパ節および肺胞洗浄液中の細胞の全てで確認された (Fig. 5)。



4. 結核菌特異的粘膜免疫の誘導: rHPIV2-Ag85B 経鼻投与マウスの肺リンパ節 (LN) と肺胞洗浄液中の Ag85B 特異的エフェクター細胞の浸潤を見たところ、LN では免疫に伴いエフェクター細胞は増加を示した。このような変化は BCG 投与マウスでは認められなかった。一方、BAL では rHPIV2-Ag85B 免疫では変化を示さなかったが、結核菌の攻撃接種後、急激なエフェクター細胞の増加が認めら

れ、このような反応は BCG 免疫より著しく高いものであった (Fig. 6)。

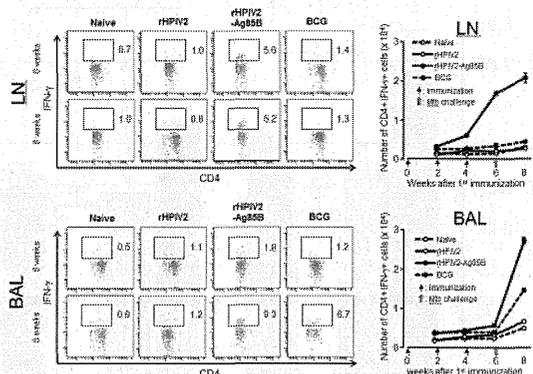


Fig. 6 免疫マウスに対する肺リンパ節細胞 (LN)、肺洗浄液細胞 (BAL) の Ag85B 特異的細胞の検出

D. 考 察

結核の唯一のワクチンである BCG は、小児の結核性髄膜炎並びに粟粒結核に対しては 80% の防御効果を示すが、成人の肺結核に対して明確な予防効果は認められない。これらのことから、新規ワクチン開発は急務であり、我が国はもとより、世界的に見ても重要な課題である。粘膜より感染を示す病原体には、感染時の粘膜での免疫反応が感染防御等に重要であり、この粘膜免疫を誘導するためには抗原を適切に粘膜面に投与しなければならない。つまり、肺結核の防御には適切な手法を用いてワクチン抗原を粘膜面へ投与することが重要である。HPIV2 は、ヒトの呼吸器粘膜に感染する病原性の低いウイルスである。近年、HPIV2 はリバースジェネティック法で作製され、安全なウイルスベクターになり得ることが示された。本研究では、結核菌抗原 Ag85B を組み込んだ HPIV2 を用い新たな経鼻投与ワクチンを開発した。本ワクチンの特徴としてベクターウイルス抗原より大量かつ早期に挿入抗原が発現することから他のウイルスベクターと異なり、頻回投与が可能であると考えられる。本研究結果でも投与回数に比例しワクチン稿が高いことが示された。また、経鼻投与ワクチンであることから粘膜免疫も期待できる。

以上本研究で用いた HPIV2 をベクターとして用いた結核ワクチンは新たなワクチンとしての可能性が示唆された。

E. 結 論

HPIV2 ベクターを用いた結核ワクチンの開発に向けて多様な知見が得られた。

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* 2014;32:1727-1735.
- 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.
2. 学会発表
- 1) Watanabe K, Matsuo K, Yasutomi Y. Intranasal immunization with recombinant vaccine by taking advantage of characteristics of human parainfluenza type 2 virus vector showed mycobacteria-specific immunity. 第42回日本免疫学会学術集会, 2013年, 千葉
- 2) TSUJIMURA Yusuke, YASUTOMI Yasuhiro. The recognition mechanisms of *Mycobacteria* major secretion protein, Ag85B, in vivo 第42回日本免疫学会学術集会, 2013年, 千葉
- 3) 加藤誠一 保富康宏 松尾和浩. BCGウレアーゼ欠損株を用いたエイズワクチン第3回感染症若手フォーラム 長崎 2014
- 4) 岡村 智崇、松尾 和浩、保富 康宏. 抗酸菌分泌抗原を組み込んだ弱毒エイズウイルスの霊長類カニクイザルにおける細胞性免疫反応の解析第61回日本ウイルス学会 神戸 2013年11月10日-12日
- 5) 岡村 智崇、松尾 和浩、保富 康宏. 産地別SPFカニクイザルを用いたサル免疫不全ウイルスのエイズ病態に関する研究第27回日本エイズ学会 熊本 2013年11月20 - 22日
- 6) 保富康宏 インフルエンザウイルス感染におけるヘルパーT細胞 (Th) の病態への関与 「シンポジウム: もっと効くインフルエンザワクチンを目指して」 第54回日本臨床ウイルス学会 2013年6月8-9日 倉敷
- 7) 保富康宏 教育講演: 「ワクチン開発のストラテジー: HIVワクチン・結核ワクチン開発の経験から」 ワクチン開発に必要な研究を取り巻く環境の重要性 第17回日本ワクチン学会 2013年11月30日-12月1

日 津

G 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

なし。

厚生労働科学研究費補助金（新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業）
分担研究報告書

粘膜免疫誘導型新規結核ワクチンの開発

結核菌抗原遺伝子組み込みパラインフルエンザ2型ウイルスの作製

分担研究者 野阪 哲哉 三重大学大学院医学系研究科 感染症制御医学分野 教授
河野 光雄 三重大学大学院医学系研究科 感染症制御医学分野 講師

研究要旨 ヒトパラインフルエンザ2型ウイルス（hPIV2）は非分節型マイナス鎖RNAウイルスであり、主に乳幼児に呼吸器系感染症を起こすが、ヒト成人における病原性は低いため、安全性の高いベクターとして有用である。我々はV遺伝子を欠損させることによってhPIV2ベクターを弱毒化、もしくはHN遺伝子を欠損させることによって非増殖型に改変し、それらのベクターに結核菌抗原Ag85B遺伝子を組み込んだ組換えワクチンの作製を試みた。

A. 研究目的

hPIV2は乳幼児における呼吸器感染症の病因ウイルスのひとつであるが、ウイルスの生活環がすべて細胞質で行われるので、宿主の染色体に影響を及ぼさず、また、成人には再感染を起こすが、重篤な疾患は引き起こさないため、ベクター化した場合、安全性が高い。さらにその増殖性を減少もしくは廃絶することによって、より安全なウイルスベクターとして利用可能となる。特筆すべきことは、他のベクターと比較して導入遺伝子の発現効率が極めて高いことである。当研究においては、HN又はV遺伝子を欠損させたhPIV2を作製し、結核菌抗原Ag85B遺伝子を搭載することによって、経気道感染可能な新規遺伝子組換え結核ワクチンを作製することが目的である。そして、現在の厚生労働行政上の大きな課題のひとつである成人結核を予防し、結核の根絶に向けた貢献をしていくことが目標である。

B. 研究方法

（組換えウイルスワクチン創生のためのコンストラクトの作製）

hPIV2 ゲノムRNAは逆転写酵素にてcDNAに変換し、プラスミドDNAとして取り扱う。種々の欠損型hPIV2ベクターを作製する。

（組換えウイルスの作製）

培養細胞中でT7 RNA polymeraseを用いて上記プラスミドを再度RNAゲノムに変換し、ウイルスRNA polymeraseと欠損させたウイルス遺伝子産物をトランスに補填することに

より遺伝子組換えウイルス粒子を作製する（リバースジェネティクス法）。

（組換えウイルス作製に必要なヘルパー細胞の作製）

T7 RNA polymeraseを発現するBHK細胞またはVero細胞にさらにhPIV2 V蛋白を恒常的に発現させた細胞株を樹立し、組換えウイルス産生に用いる。

（倫理面への配慮）

本分担研究は、ベクター産生のための基礎研究の段階であり、臨床検体も扱わないが、ヒトへの投与などを計画する場合は、事前に三重大学の研究倫理審査委員会からの承認を得る予定である。また、関連共同実験である臨床検体を用いた疫学的解析実験に関しては、すでに三重大学の研究倫理審査委員会の承認を得ている（乳幼児の上気道炎・下気道炎におけるパラインフルエンザ2型ウイルス感染の探索、承認No 2325；成人健常者におけるパラインフルエンザ2型ウイルス抗体の探索、承認No 2319）。組換えDNA実験委員会の承認（V遺伝子欠損型パラインフルエンザ2型ウイルス（PIV2）ワクチンゲノムcDNAの構築、医-623(変1)；非増殖型（HN遺伝子欠損型）パラインフルエンザ2型ウイルス（PIV2）を用いた新規ワクチン開発、医-626(変2)）も得られている。動物実験に際しては三重大学動物実験規約を遵守し、事前に詳細な実験計画を申請する。

C. 研究結果

phPIV2 ΔV、phPIV2 ΔV(EGFP)、phPIV2 ΔV(Ag85B)、phPIV2 ΔV(E1726D) (AERASより供与された4種の遺伝子を一括発現するコンストラクト)、phPIV2 ΔHN、phPIV2 ΔHN(EGFP)、phPIV2 ΔHN(Ag85B)、phPIV2 ΔHN(E1726D)を作製した(図1、図2)。また、ワクチン用組換えウイルス(hPIV2 ΔV、hPIV2 ΔV(EGFP)、hPIV2 ΔV(Ag85B))を保富グループと共同で作製した(図1)。hPIV2 ΔHN(EGFP)、hPIV2 ΔHN(Ag85B)については、三重大学単独で作製した(図2)。hPIV2 ΔV系ウイルス作製のために必要な構成的V蛋白発現BSRT7/5細胞(T7 RNA polymerase 産生BHK細胞)も樹立した。

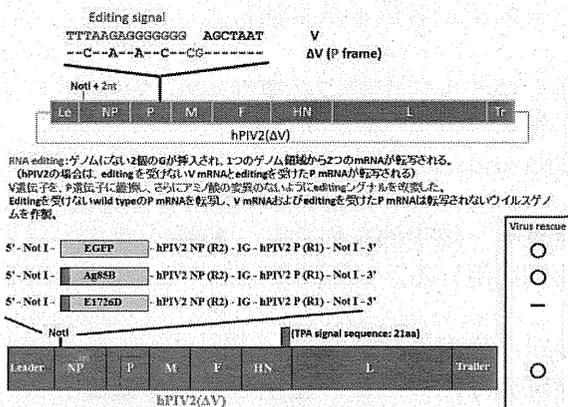


図1. hPIV2ΔV系コンストラクトならびに作製したウイルス

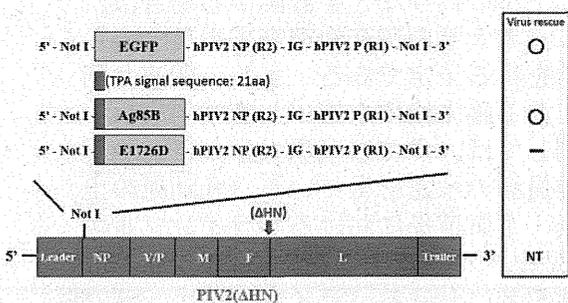


図2. hPIV2ΔHN系コンストラクトならびに作製したウイルス

D. 考察

以上の結果は概ね本研究が順調に進行していることを示すが、V欠損型hPIV2はウイルスの収量が悪く、そのため、宿主細胞のインターフェロンシグナルに関与するSTAT蛋白の分解に関わるV蛋白のC末端17、34、48アミノ酸のみを欠失させたV遺伝子と、P遺伝子を別々に発現するゲノム構造をもつhPIV2(P+VΔC)およびそのゲノムに上記遺伝子を導入したプラスミドも作製した。これらからのウイルス作製は保富グループと共同で行っている。

E1726D発現ウイルスに関しては、収量が悪く、その作製条件等を検討する必要があると考えられ、分割して発現させる方法も試している。組換えウイルスの収量を上げるには、導入遺伝子それぞれに対する至適ベクターを選択する必要がある。

E. 結論

HN遺伝子又はV遺伝子を欠損させたhPIV2ベクターを作製し、結核菌抗原であるAg85Bを発現する組換えウイルスを産生した。

F. 健康危険情報

該当せず。

G. 研究発表

1. 論文発表

Tsurudome M, Nakahashi M, Matsushima Y, Ito M, Nishio M, Kawano M, Komada H, Nosaka T. Full conversion of the hemagglutinin-neuraminidase specificity of the parainfluenzavirus 5 fusion protein by replacement of 21 amino acids in its head region with those of the simian virus 41 fusion protein. *J Virol* 87: 8342-8350, 2013.

Hara K, Fukumura M, Ohtsuka J, Kawano M, Nosaka T. Human Parainfluenza virus type 2 vector induces dendritic cell maturation without viral RNA replication/transcription. *Hum Gene Ther* 24: 683-691, 2013.

Nagai Y, Iwade Y, Hayakawa E, Nakano M, Sakai T, Mitarai S, Katayama M, Nosaka T, Yamaguchi T. High resolution melting curve assay for rapid detection of drug-resistant Mycobacterium tuberculosis. *J Infect Chemother* 19: 1116-1125, 2013.

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 Jul 3; 8(7): e66614.

Ono R, Masuya M, Nakajima H, Enomoto Y, Miyata E, Nakamura A, Ishii S, Suzuki K, Shibata-Minoshima F, Katayama N, Kitamura T, Nosaka T. Plzf drives MLL-fusion-mediated leukemogenesis specifically in long term hematopoietic stem cells. *Blood* 122: 1271-1283, 2013.

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* 32: 1727-1735, 2014.

Liu B, Ohishi K, Orito Y, Nakamori Y, Nishikawa H, Ino K, Suzuki K, Matsumoto T, Masuya M, Hamada H, Mineno J, Ono R, Nosaka T, Shiku H, Katayama N. Manipulation of human early T lymphopoiesis by coculture on human bone marrow stromal cells: Potential utility for adoptive immune-therapy. *Exp Hematol* 41: 367-376, 2013.

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* 85: 131-139, 2013.

2. 学会発表

Tsurudome M, Ito M, Nishio M, Nosaka T. Conversion of the parainfluenza virus 5 F protein to a simian virus 41 HN-specific protein by amino acid substitutions. 15th International Negative Strand Virus Meeting. June 16-21, 2013, Granada, Spain.

小埜良一、野阪哲哉. *MLL*融合遺伝子による造血細胞の癌化にはPlzfを介した異常な自己複製機構が重要である. 第65回 日本細胞生物学会大会. シンポジウム 幹細胞研究の新展開～組織発生から病態まで～ 6/19-21, 2013,名古屋.

鶴留雅人、伊藤守弘、西尾真智子、河野光雄、駒田洋、大塚順平、野阪哲哉. パラインフルエンザウイルスのHN蛋白とF蛋白の機能的相互作用の解析. 第61回日本ウイルス学会学術集会. ミニシンポジウム ウイルス エントリー 11/10-12, 2013, 神戸.

H.. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

**厚生労働科学研究費補助金
(新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業)**

「粘膜免疫誘導型新規結核ワクチンの開発」

平成25年度 分担研究報告書

ヒトパラインフルエンザ2型ウイルス (hPIV2) 感染状況に関する研究

研究分担者：庵原 俊昭 (国立病院機構三重病院)

研究協力者：菅 秀、中村 晴奈、長尾 みづほ (国立病院機構三重病院)

矢野 拓弥、西中 隆道 (三重県保健環境研究所)

研究要旨

ヒトパラインフルエンザ2型ウイルス (hPIV2) は乳幼児には感冒様疾患を起こすが、成人には病原性はあまりないといわれている。hPIV2 をベクターとした粘膜免疫誘導型新規結核ワクチンを開発する際、健常人における hPIV2 特異的抗体価に関する血清疫学、および上気道感染や下気道炎の症状のある小児においてどの程度、hPIV2 が病態に関与しているかを把握しておくことが重要である。本邦における hPIV2 感染に関する詳細な臨床ウイルス学的文献的報告は乏しく、今回の研究を計画するに至った。本年度は、臨床検体解析のための体制整備を行ない、呼吸器感染小児からの検体採取、保存およびクリニカルデータシートによる臨床情報集積を開始した。2013年11月以降に三重病院小児病棟に入院となった患者の中で、呼吸器症状を呈しかつ本研究に関するインフォームドコンセントを取得可能であった症例は現在まで47名であった。男性25名、女性22名で、年齢別症例数は、0歳16名、1歳11名、2歳5名、3歳3名、4歳4名、5歳3名、6歳3名、7歳1名、10歳1名であった。診断名は、気管支炎13名、肺炎13名が最も多く、その他細気管支炎、気管支喘息、インフルエンザ、上気道炎などであった。

A. 研究目的

ヒトパラインフルエンザ2型ウイルス (hPIV2) は乳幼児には感冒様疾患を起こすが、成人には病原性はあまりないといわれている。hPIV2 をベクター化し、外来遺伝子を組み込むことにより、粘膜免疫誘導型新規結核ワクチンを開発する際、健常人における hPIV2 特異的抗体価に関する血清疫学、および上気道感染や下気道炎の症状のある小児においてどの程度、hPIV2 が病態に関与しているかを把握しておくことが重要である。本邦における hPIV2 感染に関

する詳細な臨床ウイルス学的文献的報告は乏しく、今回の研究を計画するに至った。

本研究では、①呼吸器感染の症状のある小児の起因ウイルスとして頻度の高いもの数種類と並行して、hPIV2 の感染の有無をPCRにて探索する同時に、近縁ウイルスである hPIV1、hPIV3、hPIV4 も探索し、感染実態を把握する。患者基本情報及び臨床情報も併せて解析を実施し、病態との関連を明らかにすること、②健常小児におけるパラインフルエンザ特異的抗体価を測定し、日本における血清疫学を明らかにすること、

を目的とする。

B. 研究方法

(1) 呼吸器症状を有する小児における、感染ウイルスの検出、同定

2013年11月より咳嗽、発熱、喘鳴などの症状を呈して国立病院機構三重病院小児病棟に入院した小児より、スワブ採取棒を用いて咽頭粘液を採取した。BDユニバーサルバイラルトランスポート（ベクトンディッキンソン、日本）に浸漬した後、速やかに-80℃で保存した。検体の解析は、三重大学医学系研究科病態解明医学講座（野阪哲哉教授）で実施する。RNA抽出はTRIzol Plus RNA Purification Kitを用いて行い、RT-PCRにて主な気道ウイルス（RSウイルス、ライノウイルス、ヒトメタニューモウイルス、インフルエンザウイルス(Flu)A型、Flu B型、hPIV1、hPIV2、hPIV3、hPIV4）の検出を行う。

(2) hPIV2感染症における臨床的特徴の解析

検体採取可能であった症例においては、年齢、性別、発症月、主症状、診断名、臨床検査データ、治療内容、合併症、転帰などの臨床情報を収集した。クリニカルデータシートを作成し、診療録より情報を収集した。

(3) ヒトパラインフルエンザウイルス感染の血清疫学的解析

hPIV1、hPIV2、hPIV3、hPIV4の特異的抗体価の測定を行う。0から15歳の健常小児の保存血清を使用して、赤血球凝集抑制(HI)抗体価測定を実施する。また、母体から新生児への移行抗体解析のために、臍帯血および母体血におけるHI抗体価の測

定も実施する。抗体価測定は三重県保健環境研究所で実施する。

(倫理面への配慮)

当研究は三重病院倫理審査委員会(受付番号23-24)にて承認を受けた。

(1) 対象となる個人の人権の擁護

本研究では、被験者の氏名、住所などの個人情報収集しない。被験者の同定や照会には、匿名化IDを用いて行われる。すべての関係者は個人情報保護のため最大限の努力を払う。

(2) 対象となる個人への利益と不利益
被験者に直接的な利益はない。検体採取に侵襲性を有するため肉体的、精神的苦痛の不利益が生じる可能性がある。

(3) 対象となる個人から理解、同意を得る方法

文書による説明および文書による同意を得る。具体的には、①研究の目的・背景、②研究方法及びスケジュール、③この研究の成果によって医療にどのように貢献できるか、④本研究に参加することによる利益および不利益、⑤人権、プライバシーの保護、⑥研究協力の任意性と撤回の自由、⑦研究計画書などの開示、⑧費用負担および謝礼に関する事項、⑨研究についての問い合わせ・連絡先、などについて説明する。被験者が小児等の理由で意志の確認が困難な場合は、保護者その他の代理人を代諾者として、同意を得る。

研究内容については各主治医から対象者には文書で充分説明の上同意を得て実施している。

C. 研究結果

(1) 2013年11月以降に三重病院小児

病棟に入院となった患者の中で、呼吸器症状を呈しかつ本研究に関するインフォームドコンセントを取得可能であった症例は現在まで47名であった。症例の臨床的特徴を以下に記載する。男性25名、女性22名で、年齢別症例数は、0歳16名、1歳11名、2歳5名、3歳3名、4歳4名、5歳3名、6歳3名、7歳1名、10歳1名であった。診断名は、気管支炎13名、肺炎13名が最も多く、その他細気管支炎、気管支喘息、インフルエンザ、上気道炎などであった。

47名採取された咽頭ぬぐい液から、現在ウイルス検出、同定を行っている過程である。

(2) ヒトパラインフルエンザウイルス感染の血清疫学的解析に関しては、現在当院での保存血清を中心に検体の確保を行っている。年齢別抗体保有率解析のため、0から15歳での各年齢20検体、また母体から新生児への移行抗体解析のため、臍帯血50検体、母体血50検体をペアで準備中である。

今後、三重県保健環境研究所においてHI抗体価測定を実施する。

D. 考察

ヒトパラインフルエンザウイルスは世界中に分布し、全年齢において急性呼吸器感染症を引き起こす¹⁾。特に乳幼児においては、軽度の上気道感染症から致死的下気道感染症まで幅広い疾病の原因ウイルスとして重要である。しかしながら、特異的抗ウイルス薬が存在しないこと、ワクチンが存在しないこと、培養細胞を用いたhPIV分離が容易ではなくPCR法による遺伝子検出もあまり積極的に行われていないこと、

などの理由から本邦におけるhPIV感染(症)の実態は十分に把握されていない。

三重県における呼吸器系ウイルスの感染症発生動向調査では、2009年から2012年において呼吸器系疾患患者検体からRT-PCR法で17.3%にhPIVが検出されており²⁾、呼吸器感染ウイルスとしてのhPIVの臨床的重要性が示唆されている。

hPIV2をベクター化した粘膜免疫誘導型新規結核ワクチンの臨床応用に関して、安全性を評価、検討するためには、ワクチン接種対象となりうる年齢層のヒトにおけるhPIV2の感染疫学、臨床ウイルス学的検索が必須である。本研究では、呼吸器症状を呈して入院に至った小児より咽頭粘液を採取して、RT-PCR法によりウイルス検出を試みた。検体採取は、0歳から10歳の幅広い年齢層の小児において実施することができ、また気管支炎、肺炎といった重症下気道感染症から上気道炎などの比較的軽度の感染症までの幅広い病像を示す患者を対象とすることが可能であった。クリニカルデータシートを作成し、臨床ウイルス学的解析も可能な体制を整え情報集積も開始しており、今後RT-PCR法によるウイルス検出、同定結果と合わせて検討を行う予定としている。さらに、健常人における感染疫学を明らかにするために、HI法を用いたhPIV2特異的抗体保有率を年齢別に明らかにすることも重要であり、現在0歳から15歳までの血清を使用した解析を進めている。

E. 結論

臨床検体解析のための体制整備を行ない、呼吸器感染小児からの検体採取、保存を開始した。ベクターウイルスであるhPIV2の

国内における感染状況を、臨床ウイルス学的、血清疫学的手法を用いて明らかにすることで、本ワクチンの研究開発のための基礎的データを提供し、結核感染症制御に貢献することが可能になると考える。

(参考文献)

1) Karron RA, Collins PL: Parainfluenza viruses. Fields Virology 6th edition. Philadelphia: Wolters Kluwer / Lippincott Williams & Wilkins, 996-1023, 2013

2) 矢野拓弥、前田千恵、楠原一、赤地重宏、松野由香里、山寺基子、岩出義人、片山正彦、山口哲夫：三重県におけるパラインフルエンザウイルスの動向。三重保健研年報 57:53-56, 2012

F. 研究発表

1. 著書、論文

1) 高橋裕明、矢野拓弥、福田美和、山内昭則、大熊和行、庵原俊昭、中野貴司、松田正、鳥越貞義、二井立恵、伊佐地真知子、渡辺正博、落合仁、酒徳浩之、加藤孝、前田一洋、奥野良信、神谷齊：小児におけるインフルエンザ HA ワクチン接種量変更による効果と安全性の検討。感染症誌 87:195-206, 2013

2) 庵原俊昭：乳幼児へのインフルエンザ ワクチン接種量の増量について。小児内科 45:2037-2039, 2013

3) 矢野拓弥、前田千恵、赤地重宏、山寺基子、松野由香里、永井佑樹、小林章人、楠原一、小林隆司、福田美和、中川由美子、高橋裕明、奈良谷性子、山内昭則、天野秀臣、西中隆道、庵原俊昭：2013年9月

に分離された A(H1N1)pdm09 ウイルスの性状—三重県。IASR 34:343-345, 2013

2. 学会

1) 菅秀、長尾みづほ、藤澤隆夫、庵原俊昭：リアルタイムデータベースを用いたインフルエンザ症に入院症例の解析。第116回日本小児科学会学術集会 2013.4.19-21 広島

2) 中村晴奈、長尾みづほ、浅田和豊、菅秀、谷口清州、藤澤隆夫、庵原俊昭：多施設でのインフルエンザ入院症例の経年的検討。第45回日本小児感染症学会総会・学術集会 2013.10.27-28 札幌

3) 長尾みづほ、二井立恵、伊佐地真知子、菅秀、藤澤隆夫、庵原俊昭：インフルエンザワクチン接種後の局所の腫脹について。第45回日本小児感染症学会総会・学術集会 2013.10.27-28 札幌

4) 二井立恵、伊佐地真知子、庵原俊昭、高橋裕明、前田一洋、奥野良信：小児のインフルエンザワクチン接種量変更後の HI 抗体価の検討（接種回数と接種時期）。第17回日本ワクチン学会学術集会 2013.11.30-12.1 津

G. 知的所有権の出願・登録状況（予定を含む）

なし

厚生労働科学研究費補助金（新型インフルエンザ等・再興感染症研究事業）
分担研究報告書（平成25年度）

ワクチンベクターに対する自然免疫応答および安全性の検討

石井 健 医薬基盤研究所アジュバント開発プロジェクトプロジェクトリーダー

研究要旨： 唯一の結核ワクチンとしてBCGが用いられているが、成人の肺結核では予防効果が明確には認められておらず、新たなワクチンの開発が望まれている。ヒトパラインフルエンザ2型ウイルス(hPIV2)は病原性の低いウイルスであり、ウイルスベクターとして期待されているが、一部の遺伝子がI型インターフェロン産生を抑制するなど、自然免疫との関与も報告されている。本研究では、結核菌抗原Ag85Bを組み込んだ用いた新規ワクチンrhPIV2-Ag85Bのウイルスベクターに対する、自然免疫応答の解析と安全性の検討をする事を目的とする。

A. 研究目的

新たな結核菌ワクチンである rhPIV2-Ag85B は従来のワクチンである BCG より強く肺結核を抑制する事が、マウスを用いた研究によりあきらかとなっている。また、カニクイザルにおいても効果が高い結果が得られている。この hPIV2 は病原性が低く、ウイルスベクターとして有用である事が知られているが、一部の遺伝子が自然免疫応答を抑制するなど、ヒトでの応用へ向けて解析すべき事が残されている。本研究では、新規結核ワクチンのウイルスベクターである hPIV2 の自然免疫応答および安全性の検討を目的とする。

B. 研究方法

本研究では、種々の自然免疫関連遺伝子を欠損させたマウス胚性繊維が細胞 (MEF) を作製し、hPIV2 を感染させることによって誘導され得る自然免疫応答を、アレイを

用いて網羅的に検討するとともに、詳細な自然免疫応答のメカニズムをあきらかにする。また、hPIV2 の V 遺伝子が自然免疫応答を抑制する事が報告されている。実際に、V 遺伝子の自然免疫応答への関与をあきらかとするために、レポーター遺伝子アッセイを行った。

(倫理面への配慮)

使用された実験動物は、医薬基盤研究所動物実験委員会規程に基づき飼育され、日本動物学会が定めた、苦痛の軽減等に配慮した指針に従って実験を行った。ヒト細胞に関しては、医薬基盤研究所倫理委員会の承認を得た上で、倫理面に配慮し、実験を行った。

C. 研究結果

自然免疫応答を解析するために、種々の自然免疫関連遺伝子を欠損している MEF の

作製を行った。これら MEF を使用して、現在は感染実験をすすめている。また、hPIV2 の V 遺伝子を細胞に強発現させ、その後の自然免疫応答をレポーター遺伝アッセイにて検討したが、顕著な抑制を確認する事は出来なかった。

D. 考察

本研究で新たに自然免疫関連遺伝子欠損の MEF を作製した。今後はこの MEF を用いて、ウイルスベクターによる自然免疫応答をあきらかにすることで、実際に起こりうるであろう、生体反応を検討する。また、レポーター遺伝アッセイでは、V 遺伝子の自然免疫抑制効果が確認出来なかった。この結果を明確にする為に、再度実験を行うとともに、自然免疫関連遺伝子との相互作用を免疫沈降法を用いて検討する。

E. 結論

今回の研究により、新たに種々の遺伝子欠損の MEF の作製に成功した。この細胞を用いて、次年度で詳細な自然免疫活性化のメカニズムを検討して行く。また、V 遺伝子による自然免疫抑制効果が確認出来なかったため、V 遺伝子と自然免疫応答に関しても、詳細な解析を行っていく。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) 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, Ishii KJ. Nonagonistic Dectin-1 ligand transforms CpG

into a multitask nanoparticulate TLR9 agonist. Proc Natl Acad Sci USA. 2014 Feb 10.

- 2) Ono C, Ninomiya A, Yamamoto S, Abe T, Wen X, Fukuhara T, Sasai M, Yamamoto M, Saitoh T, Satoh T, Kawai T, Ishii KJ, Akira S, Okamoto T, Matsuura Y. Innate Immune response induced by baculovirus attenuates transgene expression in Mammalian cells. J Virol. 2014;88(4):2157-67.
- 3) Kobiyama K, Jounai N, Aoshi T, Tozuka M, Takeshita F, Coban C and Ishii KJ. "Innate Immune Signaling by, and Genetic Adjuvants for DNA Vaccination" Vaccines 2013, 1, 278-292; doi:10.3390/vaccines1030278.
- 4) Kuroda E, Coban C, Ishii KJ. Particulate adjuvant and innate immunity: past achievements, present findings, and future prospects. Int Rev Immunol. 2013;32(2):209-20.
- 5) Halder SK, Matsunaga H, Ishii KJ, Akira S, Miyake K, Ueda H. Retinal cell type-specific prevention of ischemia-induced damages by LPS-TLR4 signaling through microglia. J Neurochem. 2013 126(2):243-60.
- 6) Palacpac NM, Ntege E, Yeka A, Balikagala B, Suzuki N, Shirai H, Yagi M, Ito K, Fukushima W, Hirota Y, Nsereko C, Okada T, Kanoi BN, Tetsutani K, Arisue N, Itagaki S, Tougan T, Ishii KJ, Ueda S, Egwang TG, Horii T. Phase 1b randomized trial and follow-up study in Uganda of the blood-stage malaria vaccine candidate BK-SE36. PLoS One. 2013 28;8(5):e64073.
- 7) Kobiyama K, Kawashima A, Jounai N, Takeshita F, Ishii KJ, Ito T, Suzuki K. Role of Extrachromosomal Histone H2B on Recognition of DNA Viruses and Cell Damage. Front Genet. 2013 May 23;4:91.

- 8) Tang CK, Aoshi T, Jounai N, Ito J, Ohata K, Kobiyama K, Dessailly BH, Kuroda E, Akira S, Mizuguchi K, Coban C, Ishii KJ. The chemotherapeutic agent DMXAA as a unique IRF3-dependent type-2 vaccine adjuvant. *PLoS One*. 2013;8(3):e60038. doi:10.1371/journal.pone.0060038.
- 9) Coban C, Kobiyama K, Jounai N, Tozuka M, Ishii KJ. DNA vaccines: A simple DNA sensing matter? *Hum Vaccin Immunother*. 2013 2;9(10).
- 10) Kondo T, Kobayashi J, Saitoh T, Maruyama K, Ishii KJ, Barber GN, Komatsu K, Akira S, Kawai T. DNA damage sensor MRE11 recognizes cytosolic double-stranded DNA and induces type I interferon by regulating STING trafficking. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013 Feb 6. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 23388631.
- 11) Jounai N, Kobiyama K, Takeshita F, Ishii KJ. Recognition of damage-associated molecular patterns related to nucleic acids during inflammation and vaccination. *Front Cell Infect Microbiol*. 2012;2:168.
- 12) 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 9(2). [Epub ahead of print] PubMed PMID: 23291928.
- 13) Shiraishi K, Hamano M, Ma H, Kawano K, Maitani Y, Aoshi T, Ishii KJ, Yokoyama M. Hydrophobic blocks of PEG-conjugates play a significant role in the accelerated blood clearance (ABC) phenomenon. *J Control Release*. 2013 165(3):183-90.
- 14) Zhao H, Konishi A, Fujita Y, Yagi M, Ohata K, Aoshi T, Itagaki S, Sato S, Narita H, Abdelgelil NH, Inoue M, Culleton R, Kaneko O, Nakagawa A, Horii T, Akira S, Ishii KJ, Coban C. Lipocalin 2 bolsters innate and adaptive immune responses to blood-stage malaria infection by reinforcing host iron metabolism. *Cell Host Microbe*. 2012 12(5):705-16.
- 15) Nakayama T, Kumagai T, Ishii KJ, Ihara T. Alum-adjuvanted H5N1 whole virion inactivated vaccine (WIV) induced IgG1 and IgG4 antibody responses in young children. *Vaccine*. 2012 30(52):7662-6.
- 16) Tetsutani K, Ishii KJ. Adjuvants in influenza vaccines. *Vaccine*. 2012 30(52):7658-61.
- 17) Shoji M, Tachibana M, Katayama K, Tomita K, Tsuzuki S, Sakurai F, Kawabata K, Ishii KJ, Akira S, Mizuguchi H. Type-I IFN signaling is required for the induction of antigen-specific CD8(+) T cell responses by adenovirus vector vaccine in the gut-mucosa. *Biochem Biophys Res Commun*. 2012 425(1):89-93.
- 18) Desmet CJ, Ishii KJ. Nucleic acid sensing at the interface between innate and adaptive immunity in vaccination. *Nat Rev Immunol*. 2012 12(7):479-91.
- 19) Nakayama T, Kashiwagi Y, Kawashima H, Kumagai T, Ishii KJ, Ihara T. Alum-adjuvanted H5N1 whole virion inactivated vaccine (WIV) enhanced inflammatory cytokine productions. *Vaccine*. 2012 30(26):3885-90.
- 20) 小檜山康司、石井健. 「TLR とレクチンの共同作用」 *臨床免疫・アレルギー科*, 2013 60(40):454-462