

活性増強型 TNF 変異体の粘膜ワクチンアジュバントへの応用

萱室裕之,^{a,b} 吉岡靖雄,^{a,b,c} 阿部康弘,^a 鎌田春彦,^{a,c} 角田慎一,^{a,b,c} 堤 康央^{*,a,b,c}

Application of Bioactive Mutant TNF Alpha to a Mucosal Vaccine Adjuvant

Hiroyuki KAYAMURO,^{a,b} Yasuo YOSHIOKA,^{a,b,c} Yasuhiro ABE,^a Haruhiko KAMADA,^{a,c}
Shin-ichi TSUNODA,^{a,b,c} and Yasuo TSUTSUMI^{*,a,b,c}

^aNational Institute of Biomedical Innovation (NiBio), Laboratory of Pharmaceutical Proteomics (LPP),
7-6-8 Saito-Asagi, Ibaraki, Osaka 567-0085, Japan, ^bGraduate School of Pharmaceutical Sciences,
Osaka University, 1-6 Yamadaoka, Suita, Osaka 565-0871, Japan, and ^cThe Center
for Advanced Medical Engineering and Informatics, Osaka University,
2-2 Yamadaoka, Suita, Osaka 565-0871, Japan

(Received August 29, 2009)

A large number of emerging pathogens, such as severe acute respiratory syndrome (SARS), human immunodeficiency virus (HIV), and influenza virus are mucosally transmitted and must cross mucosal barriers to infect the host. Thus, to induce a maximal protective effect, it is desirable to apply vaccines by the mucosal route where virus infections start. Mucosal vaccines administered either orally or nasally have been shown to be effective in inducing antigen-specific immune responses at both systemic and mucosal compartments. However the mucosal antigen-specific immune response is weak because most protein antigens can evoke only a weak immune response when they are applied mucosally. Therefore, one strategy to overcome the weakness of the immune response is a co-administration of mucosal adjuvant with the vaccine antigen. Unfortunately, the development of safe and effective mucosal adjuvant has proved to be challenging. Cytokines are promising adjuvants because they are human-derived safe material and display potent immune-modulating functions. In this regards, we have created a mutant tumor necrosis factor- α (TNF- α), mTNF-K90R, that exhibits high bioactivity and resistance to proteases. In this report, we examined the potential of mTNF-K90R as a mucosal adjuvant and evaluated its effectiveness and safety.

Key words—adjuvant; cytokine; mucosal vaccine; mutant protein; phage display

1. はじめに

ワクチンが発明されたことにより、人類は天然痘を始めとする多くの感染症の恐怖から解放された。しかし、1980年頃から、HIV（ヒト免疫不全ウイルス）やエボラウイルス、SARS（重症急性呼吸器症候群）ウイルスといった致死率が極めて高い脅威のウイルスが突如として出現した時には、世界中を震撼させた。また昨今では、米国・メキシコで新型インフルエンザが流行し、発生源とみられる米国で

は、21州で爆発的に感染が拡大し、発生後まもなく160人もの死傷者をもたらした。その後、ヒトからヒトへの感染は世界的に拡大し続け、WHO（世界保健機関）が発表した2009年8月6日現在の感染確認事例数は、世界76カ国で合計177457人（うち死亡者数1462人）にも及び、わが国においても、その感染者は5000人を超えた。インフルエンザウイルスのパンデミック（世界的大流行）は以前にも人類は経験しており、1918年のスペイン風邪パンデミックでは、インフルエンザウイルスが爆発的な感染力と高い病原性を獲得したことにより、4000万人もの犠牲者をもたらしたことは周知の通りである。¹⁾このような過去の教訓から、強毒性インフルエンザウイルス等のパンデミックを抑止するため、有効で安全なワクチンの開発はまさに緊急の課題である。

さて、現在用いられているワクチンは一般に注射

^a独立行政法人医薬基盤研究所創薬プロテオミクスプロジェクト（〒567-0085 大阪府茨木市彩都あさぎ7-6-8）、

^b大阪大学大学院薬学研究科（〒565-0871 大阪府吹田市山田丘1-6）、^c大阪大学臨床医工学融合研究教育センター（〒565-0871 大阪府吹田市山田丘2-2）

*e-mail: ytsutsumi@phs.osaka-u.ac.jp

本総説は、日本薬学会第129年会シンポジウムGS3で発表したものを中心に記述したものである。

により接種されているが、これは全身性免疫に効率よく抗原特異的抗体を誘導可能である。しかし、注射によるワクチン接種では、インフルエンザや HIV など多くのウイルスの感染場所である粘膜面における免疫を十分誘導できないことが知られている。そのため、経粘膜感染するウイルスに対して、第一線のバリアとなる粘膜面に効率よくウイルス抗原特異的な免疫応答を惹起可能な新たなワクチンの開発が期待されている。²⁾ 本観点において、近年、ウイルスの自然感染経路を模倣した新たなワクチン投与方法として、抗原を経粘膜的に投与するワクチン（粘膜ワクチン）が注目を集めている。粘膜ワクチンは、全身性の免疫のみならず、従来の注射によるワクチンでは誘導することが困難とされてきた、粘膜面での感染防御免疫を誘導可能である上、ワクチン接種時に医療従事者を必要しない非侵襲的な投与方法を達成できるなど、まさに理想的ワクチンとして早期の実用化が期待されている (Fig. 1).³⁾ しかし、粘膜ワクチンでは、抗原を単独で投与しても十分な免疫を誘導することができず、免疫増強剤（アジュバント）との併用投与が必要不可欠であることが明らかとなっている。^{4,5)} これまでに、粘膜アジュバントとして、コレラ毒素（Cholera toxin : CT）や大腸菌易熱性毒素（heat labile toxin : LT）の応用が試みられてきた。しかし、これら細菌毒素由来のアジュバントは、粘膜面及び全身面において優れた粘膜アジュバント効果を発揮するものの、視神経麻痺（Bell's palsy）などの重篤な副作用を呈することが明らかとなった。事実、LT をアジュバントとして用いた、経鼻インフルエンザ不活化ワクチンの臨床試験においては、ワクチン接種と視神経麻痺との関

連が明らかとなり、臨床研究は断念されている。⁶⁾ そこで筆者らは、既にタンパク性医薬品として上市され、安全性の点で優れた実績を持つサイトカインに着目し、その粘膜ワクチンアジュバントとしての実用化、医薬品化を目指した研究開発に取り組むことにした。サイトカインは、免疫応答の制御に係わる主要な生体分子であり、樹状細胞等の抗原提示細胞に対する強力な活性化作用、さらに、T 細胞や B 細胞といった獲得免疫担当細胞の分化/増殖刺激作用など、有効性と安全性の両者が求められる粘膜ワクチンアジュバントとして魅力的な性質を兼ね備えているものと考えられる。そのため、サイトカインの粘膜アジュバントとしての応用は期待されるものの、サイトカインの粘膜面における免疫誘導メカニズムが十分解析されていないこと、また、生理活性タンパク質であるサイトカインを経粘膜投与した場合、タンパク分解酵素や pH 変化により速やかに失活・分解されてしまうこと等が原因となり、いまだ有効なサイトカイン粘膜アジュバントは開発されていない。そこで上記サイトカインアジュバントの問題点を克服すべく、われわれは、サイトカインの中でも特に免疫活性化能に優れた“腫瘍壊死因子（TNF- α ）”に着目し、独自のフェージ表面提示法を駆使した機能性人工タンパク質創製技術により、活性が野生型 TNF- α (wTNF) よりも飛躍的に向上し、かつ体内安定性にも優れた活性増強型 TNF 変異体 (mTNF-K90R) を創製し、粘膜ワクチンアジュバントとしての応用を試みてきた。⁷⁾

そこで本稿では、新型インフルエンザ等のウイルス感染症予防に叶う有効かつ安全な粘膜ワクチンアジュバント開発を目指し、独自に創出した機能性 TNF 変異体 mTNF-K90R の粘膜アジュバントとしての応用に関する研究を中心に紹介する。

2. 活性増強型 TNF 変異体の創出とその生物学的特性評価

これまでの検討から、およそ 20 種類にも及ぶ TNF スーパーファミリーサイトカインの中でも、TNF- α が特に優れた粘膜アジュバント効果を発揮すること、また重篤な副作用を伴うことなく、粘膜免疫を効率よく誘導可能であることを世界に先駆けて見い出してきた。⁸⁾ しかし、一般に TNF- α を始めとするサイトカインは免疫活性化能に優れる反面、体内安定性に乏しく、特に経粘膜投与した場合

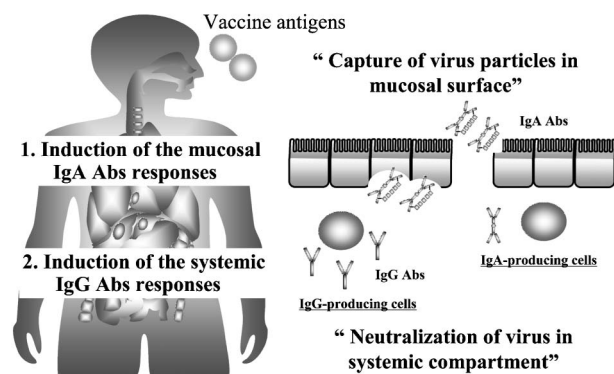


Fig. 1. Mucosal Vaccine Strategy

には、粘膜面に分泌されるタンパク分解酵素等により速やかに分解されることにより、十分なポテンシャルを発揮することができない。したがって、TNF- α を有効性に優れた粘膜アジュバントとして開発するためには、体内安定性の問題点を克服することが重要な鍵となってくる。この点、われわれは、ファージ表面提示法を駆使した、独自の“機能性人工タンパク質創製技術”を開発し、タンパク質中の任意のアミノ酸残基を他のアミノ酸残基に置換した機能性人工タンパク質を迅速に創出可能な方法論を確立してきた。そこで本技術を TNF- α に適用した結果、TNF- α 中の全 6 個のリジン残基が他のアミノ酸に置換され、さらに野生型 (wTNF) に比べて生物活性が 5.6 倍にも向上した変異体 (mTNF-K90R) の創出に世界に先駆けて成功した (Fig. 2).^{9,10} mTNF-K90R は、リジン残基の欠損によって、pI 値が大幅に低下していること (lowering pI)、また、トリプシン系タンパク分解酵素の認識配列の欠損により、wTNF と比較して生体内安定性が著しく向上していた。また驚くべきことに、mTNF-K90R は、wTNF よりも強力な生物活性を示すものの、全身毒性の指標である LD₅₀ 値は、wTNF よりも低下していることが明らかとなり、mTNF-K90R は治療濃度域を飛躍的に拡大し得る優れた特徴を有していた (Table 1).¹⁰ 以上の結果

より mTNF-K90R は、安全性を確保しつつも粘膜面における生物活性を持続的に増強し、粘膜ワクチン効果を強力に誘導できる優れたアジュバントになり得るものと考えられた。

3. 活性増強型 TNF 変異体の粘膜アジュバント特性評価

感染症に対する予防ワクチンの開発は、これまで主流であった全細胞ワクチンや弱毒化生ワクチンから、免疫原性が弱いながらも安全性の高い、成分ワクチンやサブユニットワクチンへとシフトしつつある。そのため、有効かつ安全なワクチンアジュバント開発は、次世代のワクチン開発の成功の鍵を握る最重要課題として認識されている。上述のように、粘膜ワクチン開発には、適切な粘膜アジュバントが必須となるものの、¹¹ これまで数十年にも及ぶアジュバント研究の成果も虚しく、いまだ、粘膜免疫誘導活性と安全性の問題点を克服したアジュバントは存在しない。

そこでまず、mTNF-K90R の粘膜ワクチンアジュバントとしての可能性を探るため、モデル抗原 (ニワトリ卵白アルブミン; OVA) をワクチンとして用い、mTNF-K90R とともにマウスに経鼻免疫した場合の OVA 特異的抗体産生能を評価した。その結果、OVA を単独で投与した場合には、血清中の OVA 特異的 IgG 抗体の誘導がほとんど認めら

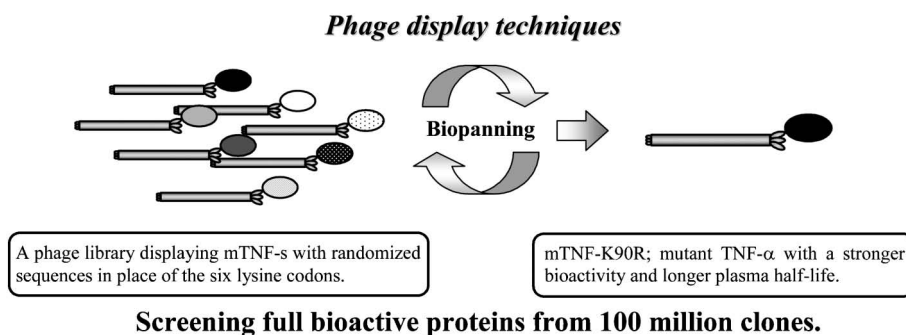


Fig. 2. Creation of a Lysine-deficient Mutant TNF- α (mTNF-K90R) by Using the Phage Library Technique

Table 1. Amino Acid Sequence and the Biological Properties of mTNF-K90R

	Residue positions						pI	AUC ($\times 10^3$ ng·min/ml)	LC ₅₀ (ng/ml)	LD ₅₀ (μ g/ml)
	11	65	90	98	112	128				
wTNF	K	K	K	K	K	K	7.44	28 \pm 2	0.17	390
mTNF-K90R	A	S	R	A	L	T	4.96	62 \pm 7	0.03	510

pI: isoelectric point, AUC: area under the blood concentration time curve, LC₅₀: lethal concentration 50.

れなかったのに対して, wTNF を併用投与したマウスにおいては, OVA 特異的抗体産生が増強されていた. さらに, mTNF-K90R 共投与による抗原特異的 IgG の誘導は, wTNF の投与と比べて有意に増強されており, 粘膜免疫誘導活性に優れたコレラ毒素構成成分 (CTB) と同程度のアジュバント活性を有してしていた [Fig. 3 (A)]. また, mTNF-K90R により誘導された OVA 特異的 IgG 抗体サブクラスを解析したところ, IgG2a の誘導はほとんど認められず, IgG1 優位な抗体産生が認められたことから, 2 型ヘルパー T 細胞 (Th2) 依存的に抗体産生を増強したものと考えられた. 次に, OVA と mTNF-K90R を併用投与したマウスから回収した鼻腔洗浄液, 膣洗浄液, 糞便抽出液中における OVA 特異的 IgA 産生を評価した. その結果, OVA 単独投与群と比較して wTNF 併用投与群において, OVA 特異的 IgA の誘導が増強していた. また, mTNF-K90R 併用投与群では, その効果が更に向上しており, 投与局所である鼻粘膜面のみならず, 腸管及び膣といった遠隔の粘膜面においても, mTNF-K90R による粘膜ワクチン効果の増強が認められた [Fig. 3 (B)]. 以上の結果より, mTNF-K90R は, ワクチン抗原特異的な抗体を粘膜面 (IgA) と全身面 (IgG) に効率よく誘導可能であり, 優れた粘膜アジュバントになり得ることが示唆された. そこで続いて, mTNF-K90R による抗原特異的免疫誘導機序を解析する目的で, 先と同様に免疫したマウスから脾細胞を回収し, OVA 特異的サイトカイン産生能を ELISPOT アッセイにて評価し

た. その結果, mTNF-K90R 投与マウス脾細胞の IFN- γ の産生は, OVA 単独投与群と同程度であったのに対し, IL-4 の産生は OVA 単独投与群の 6 倍, また, wTNF と比較した場合においても, およそ 3 倍強力に誘導されていた. 以上の結果より, mTNF-K90R による粘膜アジュバント活性の増強には, 抗原特異的 IL-4 の産生を主体とした Th2 依存的免疫応答の増強に基づくものであることが明らかとなった. さらに, mTNF-K90R の粘膜ワクチンアジュバントとしての安全性を評価する目的で, 投与局所部位における組織傷害性及び炎症性細胞浸潤の程度を病理組織学的に解析した. その結果, 粘膜アジュバント効果を発揮するのに必要な投与量の 25 倍もの過剰量を複数回投与した場合においても, mTNF-K90R の鼻粘膜組織に及ぼす傷害性等は全く認められなかった. 以上の結果を総合すると, mTNF-K90R は, 投与局所の粘膜面に毒性を示すことなく, 抗原特異的な免疫応答を強力に誘導可能であり, 安全かつ効果的な粘膜アジュバントになり得るものと期待される.

4. ウイルスを標的とした活性増強型 TNF 変異体の有効性評価

現行のポリオ生ワクチンは, 自然感染経路同様に経口で接種され, 血清中における IgG 抗体に加えて, 腸管粘膜面において IgA 抗体産生を誘導することにより, 抜群の感染防止効果を発揮する.¹²⁾ このポリオ生ワクチンの成功事例にならない, 近年では, 上気道粘膜を介して感染するインフルエンザウイルスや腸管・膣粘膜を介して感染する HIV という

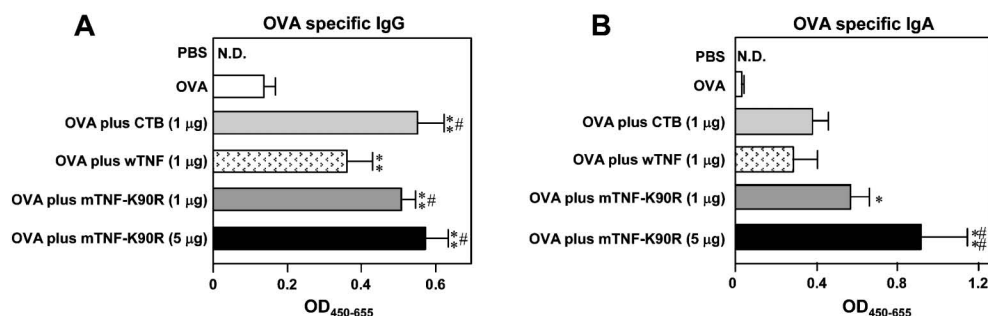


Fig. 3. Serum OVA-specific IgG Abs and Mucosal OVA-specific IgA Abs Response after Nasal Immunization with OVA Plus Adjuvant

BALB/c mice were intranasally immunized with OVA alone, OVA plus CTB, OVA plus wTNF- α or OVA plus mTNF-K90R once a week for three consecutive weeks. Serum and nasal washes were collected 1 wk after the last immunization and analyzed by ELISA for OVA-specific IgG (A) at a 1 : 100 dilution of serum and OVA-specific IgA (B) at a 1 : 8 dilution of nasal washes. Data represents the mean of absorbance 450 nm (reference wave, 655 nm). N.D.; not detected. Data are presented as means \pm S.E.M. ($n=7$; $*p<0.05$, $**p<0.01$ versus value for OVA alone treated group by ANOVA; $\#p<0.05$, $\#\#p<0.01$ versus value for OVA plus wTNF- α treated group by ANOVA).

った経粘膜感染型ウイルスを標的として、粘膜ワクチンが盛んに研究されている。^{13,14)}しかし、有効性と安全性に優れたアジュバントが存在しないことが、粘膜ワクチン開発を推進する上での律速段階となっており、その点、われわれが独自に創出した mTNF-K90R は、このような問題点を克服し、粘膜アジュバント開発のブレイクスルーになるものと期待される。そこで、mTNF-K90R のウイルスワクチンアジュバントとしての有効性を検証する目的で、インフルエンザウイルス (H1N1:A ソ連型) の HA タンパク質、及び、HIV-1 エンベロープタンパク質である gp120 をワクチン抗原として、mTNF-K90R によるウイルス抗原特異的抗体誘導能を評価した。その結果、HA タンパク質とともに mTNF-K90R を経鼻投与したマウスにおいては、HA タンパク質を単独で投与したマウス及び、CTB を併用投与したマウスと比較して、血清中における HA 特異的 IgG 産生、並びに鼻腔洗浄液中、唾液中における IgA 産生とともに増強していた [Fig. 4 (A)]. また、gp120 をワクチン抗原として用いた場合においても、mTNF-K90R による粘膜アジュバント効果が認められ、全身面と粘膜面ともに抗原特異的抗体を誘導増強可能であった [Fig. 4 (B)].

以上の結果より、mTNF-K90R は、インフルエンザや HIV を始めとするウイルス感染症予防に叶う、優れた粘膜ワクチンアジュバントになり得るものと考えられる。

5. おわりに

2009 H1N1 ウイルスによるパンデミックに伴い、欧米の製薬企業が中心となって、ワクチン開発が急ピッチで進められている。しかし、現在、FDA (米国医薬品食品局) が承認しているワクチン製造法では、ワクチンの製造に 4-6 ヶ月もの長期間を必要とし、かつ、その供給量が限定されることから、パンデミック発生時に必要な莫大な需要を賄うことは到底不可能である。したがって、少ない抗原量でワクチン効果を発揮させなければならず、免疫応答惹起を補完するためにも、アジュバントとの併用投与が必須となってくる。¹⁵⁾ これまで数十年のアジュバント研究にもかかわらず、全身投与型のアジュバントである Alum (水酸化アルミニウムゲル) が唯一米国で承認されたにすぎず、粘膜アジュバントは皆無である。このような背景から、今後の粘膜ワクチンの実用化と一層の進展に向けての最大の鍵は、安全性と有効性の両者のバランスに優れたアジュバントの開発にあると言える。本稿では、TNF-

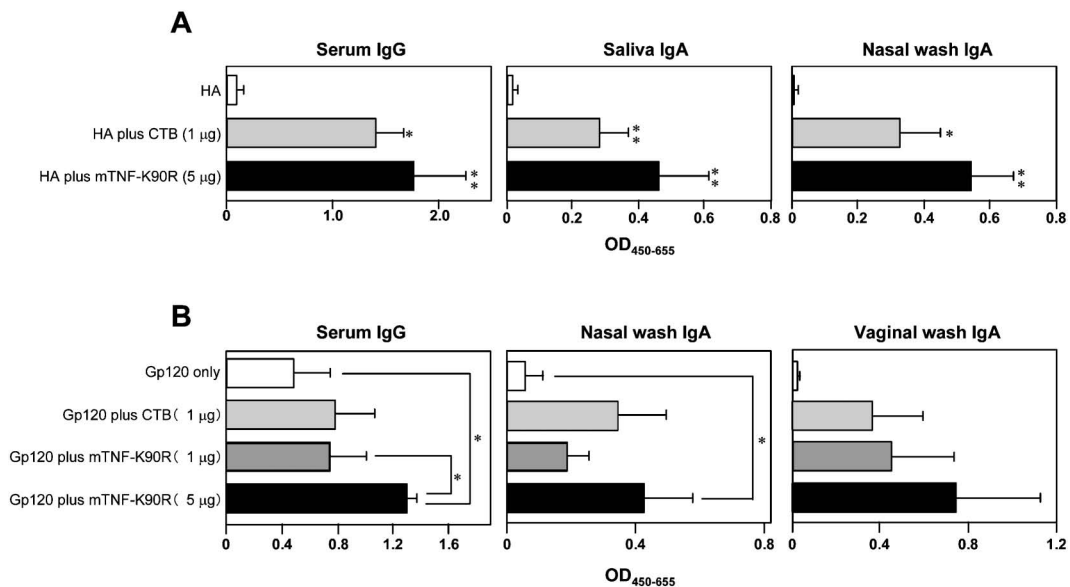


Fig. 4. mTNF-K90R Induced Mucosal IgA and IgG Responses against Influenza Virus HA or HIV-1 gp120 in Mice

In influenza studies, BALB/c mice were immunized intranasally with HA together with 1 µg CTB or 5 µg mTNF-K90R. One week after the last immunization, HA-specific IgG in serum at a 1 : 500 dilution and IgA in nasal or saliva at a 1 : 8 dilution were assessed by ELISA at a 1 : 8 dilution. Data represents the mean of absorbance 450 nm (reference wavelength, 655 nm). N.D.; not detected. Data are presented as means ± S.E.M. ($n=4-6$; * $p<0.05$, ** $p<0.01$ versus value for HA alone treated group by ANOVA). In HIV studies, BALB/c mice were intranasally immunized with gp120 alone, gp120 plus CTB, or gp120 plus mTNF-K90R once a week for four weeks. Serum and mucosal secretions were collected 7 days after the last immunization and analyzed by ELISA for gp120-specific IgA in 8-fold diluted nasal wash or vaginal wash. Data are presented as mean ± S.E.M. ($n=6$; * $p<0.05$).

α を素材として創出した mTNF-K90R の粘膜アジュバントとしての適用可能性に関する検討により、1) mTNF-K90R が、ワクチン抗原特異的抗体の誘導を粘膜面・全身面ともに増強可能であること、2) mTNF-K90R の投与局所部位である鼻粘膜面において、高い安全性を保持すること、3) mTNF-K90R は、インフルエンザウイルスや HIV といったウイルス抗原に対しても、抗原特異的抗体を粘膜面と全身面の両者に効率よく誘導することが明らかとなり、mTNF-K90R は粘膜免疫誘導活性と安全性の両者のバランスに非常に優れた粘膜アジュバント特性を有すると言える。また、mTNF-K90R を経鼻粘膜アジュバントとして適用した場合、抗体産生を主体とする体液性免疫を誘導することが判明している。しかし、HIV によるウイルス感染を効果的に抑制するためには、体液性免疫のみならず、細胞性免疫をも効率よく誘導することが重要となってくる。¹⁶⁾ このような観点から、現在、細胞性免疫誘導能に優れたサイトカインの探索にも着手しており、抗原特異的 IgA 抗体と MHC class I 拘束性の CD8⁺CTL 誘導をともに増強するサイトカインの同定にも成功している。したがって、今後、感染標的となるウイルス種に応じて適切なサイトカインを選択すれば、体液性免疫あるいは細胞性免疫の誘導を任意に制御することが可能となり、更なる有効かつ安全な粘膜ワクチン開発戦略につながるものと期待される。また一方で、本粘膜ワクチンシステムを病原体のみならず、生体内分子に対する抗体誘導に応用することができれば、新たな疾患治療法が確立可能と考えられる。例えば、サイトカインに対する自己抗体を自在に誘導できれば、サイトカインの過剰産生が病態に係わる種々の難治性免疫疾患の新規治療法になり得ると期待される。更なる検討は必要であるが、本研究を、広義のワクチン療法、あるいは抗体誘導療法ともいふべき新しい疾患予防・治療法として展開していきたいと考えている。

謝辞 本研究の遂行に際し、多くのアドバイスを頂きました。財東京都医学研究機構 東京都臨床医学総合研究所花粉症プロジェクト 廣井隆親先生、大阪大学大学院薬学研究科分子生物学分野 形山和史先生に感謝申し上げます。また本研究は、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及びエイズ対策研究事業の支援を受けて実施したものです。

REFERENCES

- 1) Tumpey T. M., Basler C. F., Aguilar P. V., Zeng H., Solórzano A., Swayne D. E., Cox N. J., Katz J. M., Taubenberger J. K., Palese P., García-Sastre A., *Science*, **310**, 77-80 (2005).
- 2) Holmgren J., Czerkinsky C., *Nat. Med.*, **11**, S45-S53 (2005).
- 3) Kunisawa J., Gohda M., Kiyono H., *Yakugaku Zasshi*, **127**, 319-326 (2007).
- 4) Ada G., *N. Engl. J. Med.*, **345**, 1042-1053 (2001).
- 5) Petrovsky N., Aguilar J. C., *Immunol. Cell Biol.*, **82**, 488-496 (2004).
- 6) Mutsch M., Zhou W., Rhodes P., Bopp M., Chen R. T., Linder T., Spyr C., Steffen R., *N. Engl. J. Med.*, **350**, 896-903 (2004).
- 7) Kayamuro H., Abe Y., Yoshioka Y., Katayama K., Nomura T., Yoshida T., Yamashita K., Yoshikawa T., Kawai Y., Mayumi T., Hiroi T., Itoh N., Nagano K., Kamada H., Tsunoda S., Tsutsumi Y., *Biomaterials*, **30**, 5869-5876 (2009).
- 8) Kayamuro H., Yoshioka Y., Abe Y., Katayama K., Yoshida T., Yamashita K., Yoshikawa T., Hiroi T., Itoh N., Kawai Y., Mayumi T., Kamada H., Tsunoda S., Tsutsumi Y., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **384**, 296-300 (2009).
- 9) Yamamoto Y., Tsutsumi Y., Yoshioka Y., Nishibata T., Kobayashi K., Okamoto T., Mukai Y., Shimizu T., Nakagawa S., Nagata S., Mayumi T., *Nat. Biotechnol.*, **21**, 546-552 (2003).
- 10) Shibata H., Yoshioka Y., Ikemizu S., Kobayashi K., Yamamoto Y., Mukai Y., Okamoto T., Taniai M., Kawamura M., Abe Y., Nakagawa S., Hayakawa T., Nagata S., Yamagata Y., Mayumi T., Kamada H., Tsutsumi Y., *Clin. Cancer Res.*, **10**, 8293-8300 (2004).
- 11) Reed S. G., Bertholet S., Coler R. N., Friede M., *Trends Immunol.*, **30**, 23-32 (2008).
- 12) Kiyono H., Fukuyama S., *Nat. Rev. Immunol.*, **4**, 699-710 (2004).
- 13) Ichinohe T., Watanabe I., Ito S., Fujii H.,

- Moriyama M., Tamura S., Takahashi H., Sawa H., Chiba J., Kurata T., Sata T., Hasegawa H., *J. Virol.*, **79**, 2910–2919 (2005).
- 14) Belyakov I. M., Isakov D., Zhu Q., Dzutsev A., Berzofsky J.A., *J. Immunol.*, **178**, 7211–7221 (2007).
- 15) Leroux-Roels I., Borkowski A., Vanwolleghem T., Dramé M., Clement F., Hons E., Devaster J. M., Leroux-Roels G., *Lancet*, **370**, 580–589 (2007).
- 16) Berzofsky J. A., Ahlers J. D., Janik J., Morris J., Oh S., Terabe M., Belyakov I. M., *J. Clin. Invest.*, **114**, 450–462 (2004).