

天然物のウイルス感染症に対する有用性の評価と応用

林 京子,* 林 利光, 李 貞範

Evaluation and Application of Natural Products for Viral Infections

Kyoko HAYASHI,* Toshimitsu HAYASHI, and Jung-Bum LEE

Graduate School of Medicine and Pharmaceutical Sciences for Research, University of Toyama,
2630 Sugitani, Toyama 930-0194, Japan

(Received August 28, 2009)

The limited efficacy and significant clinical toxicity of combination interferone and ribavirin therapy have generated strong interest in developing novel inhibitors of hepatitis C virus (HCV) replication. Recently, a growing understanding of the structure and function of critical viral enzymes and the development of HCV replicons have accelerated the development of highly specific candidate antiviral agents. In the life cycle of HCV, enveloped virions bind and penetrate into host cell using viral envelope glycoproteins. In the cytoplasm, the viral RNA genome serves as mRNA, and produces viral protein as a long polyprotein that is cleaved by both host and viral proteases. Progeny virions assemble by budding into ER/Golgi apparatus, where the glycoproteins mature, and are released at the cell surface. All stages of replication cycle from the attachment of virus to the release of progeny should be antiviral targets. We have searched for antiviral candidates from natural resources for about 20 years. So far, we have found several classes of compounds with unique antiviral action. Among them, anionic substances interfere with virus attachment and/or entry, several substances inhibit the maturation of virus-specific glycoproteins, low molecules can inhibit the virus release from infected cells, glycerol derivatives reduce the pathogenicity of virus, and some compounds exert virucidal action that impairs the ability of virus to infect host cells. These substances might be worthy to be evaluated as novel anti-HCV agents by using HCV replication systems in cultured cell lines.

Key words—natural product; hepatitis C virus; antiviral target; drug resistance

1. はじめに

C型肝炎ウイルス (HCV) 感染症を治療面からみると、いくつかの特徴がある。その1つは、エイズウイルス (HIV) 感染症と同様に、慢性ウイルス感染症であるという点である。HIVは、自らの逆転写酵素によってウイルス RNA を DNA に逆転写し、これをヒト染色体中に挿入するため、遺伝情報は終生存続することになり、現行の薬剤を用いても HIV 感染症は根治不能である。これに対して、HCV 感染症は、根治可能である。¹⁾ また、2つ目の特徴として治療薬が挙げられる。すなわち、代表的な抗ウイルス薬として、単純ヘルペスウイルス 1 型、2 型及び水痘・帯状疱疹ウイルスの DNA 合成阻害

剤アシクロビル、HIV の逆転写酵素阻害剤アジドチミジン、インフルエンザウイルスのノイラミニダーゼ阻害剤オセルタミビル等がある。これらの薬剤を含めて、現在までに認可されている抗ウイルス薬のほとんどは、その作用標的が明確になっている。一方、HCV 感染症の治療にはペグ化インターフェロン- α とリバビリンが併用されているが、これらの薬剤の抗ウイルス作用メカニズムはいまだに十分には解明されていない。しかも、その有効性は、HCV の遺伝子型に大きく依存している。

このような事情から、新規抗 HCV 剤の開発は重要な課題となっている。HCV 増殖の作用標的として新たに検討されているのは、NS5B ポリメラーゼ、NS3 ヘリカーゼ、NS3/4 プロテアーゼ等がある。^{2,3)} しかしながら HIV との共通点として、HCV には、選択圧をかけると迅速に薬剤耐性ウイルスを生じさせ得るという問題がある。耐性ウイルスは、不適切な薬剤投与や不完全なウイルス増殖抑制の結果とし

富山大学大学院医学薬学研究部 (〒930-0194 富山市杉谷 2630)

*e-mail: khayashi@pha.u-toyama.ac.jp

本総説は、日本薬学会第 129 年会シンポジウム S33 で発表したものを中心に記述したものである。

て生じる。この薬剤耐性問題は、“Antiviral Drug Resistance” シンポジウムが連続して開催されているという状況にもあらわれているように、深刻なものとして認識されている。

2. ウイルス感染症対策の問題点

従来のウイルス感染症対策としては、ワクチン接種による予防が重視されてきた。しかし、HIV や A 型インフルエンザウイルス等にみられるように抗原変異を高頻度で起こすウイルスや、ヘルペスウイルスにみられるように潜伏感染するウイルスについては、ワクチンによる予防効果は期待できない。

一方、治療を主たる目的とする化学療法剤（抗ウイルス薬）の開発が試みられてきて、一定の成果をあげている。しかし現状では、治療対象がヘルペスウイルス、HIV、インフルエンザウイルス、B 型・C 型肝炎ウイルスによる感染症にほぼ限定されている。しかも、抗ウイルス薬の投与に起因する副作用の発生や薬剤耐性ウイルスの出現がいずれのウイルス感染症の場合にも重大な問題となっている。特に治療が長期に及ぶ場合には、投薬の経済的負担が大きくなるという問題も加わる。

抗ウイルス薬を巡る問題の中で最も重視しなければならないのは、薬剤耐性問題である。耐性ウイルスが出現すれば、単にその患者の薬剤治療効果が消滅するだけでなく、ほかの個体に伝播すると治療手段のない感染症を発生させる恐れもあるという事態になる。これまでに開発・市販されてきた抗ウイルス薬の大部分は、ウイルス酵素を特異的に阻害するものであり、ウイルスの変異を誘導し易いことが広く知られるようになってきた。そのため、今後のウイルス感染症治療薬を開発する上では、薬剤耐性の出現の有無が極めて重視すべきキーワードとなってくる。

薬剤耐性を克服するための戦略としては、次の点が考えられる。すなわち、新規の作用標的の設定と、多剤併用療法である。前者については、ウイルス側の因子として、宿主細胞へのウイルス粒子の感染成立を宿主細胞の外側で阻止できる殺ウイルス作用とウイルス吸着・侵入阻止効果、及び、感染細胞内においてウイルスの機能ではなくウイルス増殖に関与する宿主細胞の機能への干渉を挙げることができ、また、生体側の因子としては、ウイルスという“異物”に対抗する感染防御機能（免疫機能）の刺

激を挙げられる。後者の多剤併用については、作用メカニズムの異なる 2 種類以上の薬剤の組み合わせが考えられる。

3. HCV の増殖サイクルと作用標的候補

HCV は、ウイルス粒子の表面に存在する糖タンパク質を用いて宿主細胞に吸着・侵入後、細胞質において脱殻し、ウイルスゲノム RNA から 1 本の前駆タンパク質（polyprotein）が合成される。このタンパク質は、宿主とウイルスに由来するプロテアーゼによってプロセッシングを受け、10 個のタンパク質が生成される。小胞体／ゴルジ装置で糖タンパク質が成熟した後、素材を組み立てて、子孫ウイルスが細胞外へ放出される。現在開発中の HCV 特異的阻害剤のほとんどは、HCV 酵素を作用標的としている。しかし、ウイルスゲノムを複製する RNA 依存性 RNA ポリメラーゼは、校正機能を有しないために、ウイルス RNA 合成に際して高頻度に変異を起こし、その結果として薬剤耐性変異ウイルスが出現し易いという問題がある。⁴⁾

前節で述べた薬剤耐性克服のための戦略を、HCV の増殖パターンに当てはめると、HCV 粒子の感受性細胞への吸着及び侵入段階、細胞内で組み立てられた子孫ウイルスの細胞外への放出段階、放出された感染性ウイルスが、新規の作用標的となり得る。また、HCV 粒子のエンベロープには E1 及び E2 の 2 種類の糖タンパク質が存在する。この糖タンパク質の糖鎖部分は、ウイルスゲノムに規定されるのではなく、宿主側の機能に基づいて小胞体とゴルジ装置でプロセッシングされて、成熟する。この糖鎖合成過程には多くの宿主由来酵素が関与している。DNA の遺伝情報に基づいて合成される宿主タンパク質は、RNA ゲノムに頼る HCV タンパク質に比べて、変異の出現頻度が低いため、ウイルス増殖に必須のこのような宿主側因子を作用標的にすれば、耐性ウイルスの出現を抑制できる可能性がある。

4. 抗ウイルス薬開発における天然物の特性と有用性

市販抗ウイルス薬の開発を振り返ってみれば、特定のウイルス酵素に対する阻害活性を出発点として、作用標的を開発当初から絞り込み、かつ低分子のみを対象としていることが多い。これに対してわれわれは、天然素材が、多様な化学構造を持つ低

分子物質と高分子物質との両方を含有していること、また、感染症がウイルス側因子と生体側因子（感染防御機能）の両者のバランスの上に立って経過することに注目して、できる限り多くの因子を取り込んだ評価系を構築して、有用物質を検索し、最終段階として抗ウイルス作用標的の解明を目指すという手段をとってきた。このことによって、天然素材から未知の作用特性を有する化合物や、選択的毒性の高い化合物を見出す可能性が出てくると考えている。特に最近では、これまでの認可抗ウイルス薬の臨床利用経験に基づく知見から、薬剤耐性が大きな社会的問題を引き起こすとの認識の上に立って、耐性ウイルスを生じさせない薬剤の開発にはいかなる作用標的が望ましいのかを常に念頭に置いている。

過去 20 年余の間に主として植物、藻類、放線菌を対象として行ってきた抗ウイルス活性物質の探索研究の中で、HCV 増殖阻害研究にも応用し得る例として、①ウイルスの吸着・侵入段階を干渉する酸性多糖体、②子孫ウイルスの放出段階を阻止する低分子物質、③ウイルス粒子の感染力を消失させる殺ウイルス活性物質、④ウイルス糖タンパク質の成熟を阻止する糖鎖合成阻害物質、⑤感染防御機能刺激物質などがある。それらの例を下記に示す。

4-1. ウイルスの吸着・侵入阻害効果を有する酸性多糖体 藍藻の一種であるスピリリナ (*Spirulina platensis*) にはウイルスの侵入を阻止する効果があり、抗ウイルス活性を指標にして有効成分の分離を試みたところ、calcium spirulan と命名した硫酸化多糖が得られた。^{5,6)} その構造分析の結果、ラムノースと 3-O-ラムノースを主構成糖とする珍しい構造を有する物質であることが明らかになった。⁷⁾ 本物質の抗ウイルス作用様式を詳細に検討したところ、HIV 感染細胞と非感染細胞との間で起こる細胞融合を強力に阻止し、さらに単純ヘルペスウイルス 1 型 (HSV-1) の吸着・侵入阻害が主たる作用標的であることがわかった。⁸⁾ この一連の研究に端を発して、藻類には抗ウイルス活性物質が存在する可能性があると考え、日本で入手可能な藻類 49 種類について、抗ウイルス活性スクリーニングを行ったところ、4 種類が抗 HSV-1 作用を、8 種類が抗 HIV 作用を示した。⁹⁾ そのうちで、食用褐藻の一種アカモク (*Sargassum horneri*) から分離した硫酸

化多糖体にも、強力な抗 HSV-1, HIV 及びヒトサイトメガロウイルス活性が認められた。^{10,11)} さらにワカメのメカブからは硫酸化多糖体の一種であるフコイダン単離し、その作用標的もウイルスの宿主細胞への吸着・侵入段階であった。¹²⁾ 一方、硫酸基を持たない酸性多糖体も、砂漠の乾燥地帯で生育する髪菜 (*Nostoc flagelliforme*) や富山湾の深層水中に見い出された珪藻 (*Navicula directa*) からそれぞれ分離でき、いずれもウイルスの宿主細胞への感染段階を干渉する抗ウイルス活性物質であった。¹³⁻¹⁵⁾ これらの酸性多糖体の共通点として、HSV や HIV、インフルエンザウイルスなどのエンベロープを有するウイルスに対しては増殖阻害効果を示すが、ポリオウイルスなどのエンベロープを持たないウイルスに対しては無効であることが挙げられる。HCV はエンベロープを有することから、酸性多糖体の存在下では増殖阻害が起こると推定される。すなわち、HCV が肝細胞から放出されて、新たな非感染肝細胞へ結合しようとする際に、多糖体が妨害し、感染拡大が阻止される可能性がある。

4-2. 子孫ウイルスの放出段階を阻止する低分子物質 ヒユ科植物空心蓮子草 *Alternanthera philoxeroides* から得られたサポニン chikusetsusaponin IVa は、HSV-1, HSV-2, ヒトサイトメガロウイルス、麻疹ウイルス、ムンプスウイルスに対して顕著な増殖阻害活性を示した。HSV-2 に対する本化合物の増殖阻害作用標的を検討した結果、感染細胞からの子孫ウイルスの放出を抑制した (Fig. 1)。¹⁶⁾ 同時に、本化合物は殺ウイルス活性も示した。このように、ウイルス粒子が感染細胞から

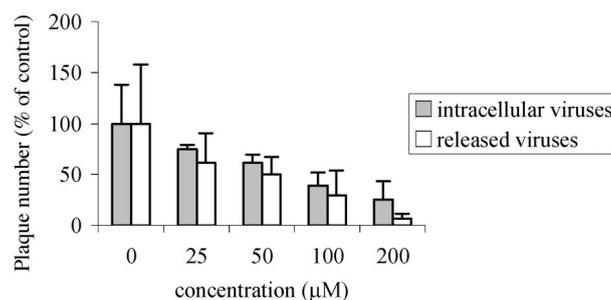


Fig. 1. Effect of Chikusetsusaponin IVa on HSV-2 Release from Infected Cells

Vero cells were infected with virus at 1 PFU/cell for 1 h. After incubation for 18 h in the presence of the compound, the virus titers in the culture media and the infected cells were determined for virus release and the intracellular viruses, respectively.

飛び出す段階や飛び出した後に作用すれば、ウイルスの代謝系に直接作用することはないので、薬剤耐性が生じ難いと推測される。また、本化合物の詳細なウイルス放出抑制作用のメカニズムは不明であるが、広域の抗ウイルス活性スペクトルを有することから考えると、HCVも含めてほかのウイルスに対しても同様の効果を及ぼすことが期待できる。このような放出阻害物質は、HCVを肝細胞内に封じ込めるといった効果を及ぼすために、ウイルスの周囲への伝播に伴う発症や症状増悪を阻止できるのではないかと推察される。

4-3. ウイルス粒子の感染力を消失させる殺ウイルス活性物質 熱帯薬用植物 *Scoparia dulcis* から単離されたジテルペノイド scopadulciol は、HSV-1の増殖を阻害した。本化合物は、DNAポリメラーゼ阻害剤として知られる aphidicolin と極めて類似する構造を有するが、aphidicolin とは異なり、HSV-1由来ポリメラーゼ活性阻害効果を示さなかった。抗HSV-1活性は、ウイルスに対する直接的な不活化効果（殺ウイルス活性）であることがわかった。¹⁷⁾ 同時に、本化合物は、HSV特異的チミジンキナーゼの活性を高める作用があり、そのため抗ヘルペス薬アシクロビルやガンシクロビルと併用することによって、これらの薬剤の効果を相乗的に増強した。^{17,18)} また、*Callicarpa japonica* 由来の 5,6,7-trimethoxyflavone は、HSV-1、ヒトサイトメガロウイルス及びポリオウイルスに対して殺ウイルス活性を示した。¹⁹⁾ 殺ウイルス作用メカニズムとしては、ウイルス粒子の破壊とウイルス粒子への特異的・非特異的結が考えられる。このメカニズムから推測されるように、殺ウイルス活性物質はウイルス特異性が低く、そのためにHCVなどのほかのウイルスにも有害な影響を及ぼすことが期待できる。HCVが肝細胞に感染して増殖拡大を続けるためには、子孫ウイルスをいったん細胞外へ放出して新たなターゲットにたどり着く必要がある。殺ウイルス活性物質は、この時の放出されたウイルスと相互作用することによって、感染拡大を阻止する役割を果たすことが期待される。

4-4. ウイルス糖タンパク質の成熟を阻止する糖鎖合成阻害物質 放線菌及び真菌の培養物 2250 検体から調製したエキスについて抗HSV-1活性スクリーニングを行ったところ、2種類の *Strep-*

tomyces sp. が強力な増殖阻害活性を示した。抗ウイルス活性を指標として有効成分の単離を試みた結果、グリセロール誘導体と concanamycin 類とがそれぞれ得られた。^{20,21)} これらの化合物は、HSV-1特異的糖タンパク質の合成に異常をもたらした。高濃度のグリセロール誘導体存在下で増殖したウイルスについて、感受性試験を行ったところ、本化合物に耐性を示した。このことから、本化合物が、宿主細胞ではなく、ウイルス自体の増殖に影響を与えることが確認された。この耐性ウイルスを分析したところ、HSV-1のエンベロープに存在する糖タンパク質である gC や gD に異常が認められた。その後の分析結果から、耐性ウイルスの gC 遺伝子の塩基配列は、もとの野生株と全く同じであることが明らかになり、グリセロール誘導体はウイルス糖タンパク質の合成過程において、タンパク質部分ではなく糖鎖部分の代謝に影響することが示唆された（未発表データ）。さらに、この耐性ウイルスをマウスに感染させたところ、野生株と比較して、病原性が減弱していることがわかった。これらのことから、グリセロール誘導体は、ウイルスの糖タンパク質合成に影響を与え、ウイルスの生体内での増殖能を低下させるような変化を引き起こすと言える。このようなグリセロール誘導体の作用は、ほかのエンベロープを有するウイルスを用いても確認できたことから、ウイルス特異性は低いと推察される。そこで、同じエンベロープを有するウイルスである HCV への応用も可能ではないかと考えられる。現在、本化合物の作用特性を詳細に検討中である。

4-5. 感染防御機能刺激物質 ウイルス感染症の成立・経過は、ウイルス側の病原性だけに依存しているわけではなく、生体の免疫機能の状態によっても大きな影響を受ける。これまでに一般的に多糖類が免疫賦活化効果を有するとの報告が多数なされてきたが、ウイルス感染症の治癒に対する寄与はあまり詳細に検討されていなかった。

われわれは、先述のメカブ由来フコイダン (M-FU) が、培養細胞を用いた *in vitro* のアッセイ系で強力な抗ウイルス活性を示したことから、本多糖体の *in vivo* での有効性を確認するために、HSV-1感染マウスへ本物質を経口投与したところ、生存率や発症の程度に改善が認められた。²²⁾ M-FU は、分子量 9000 であり、体内吸収を経て抗ウイルス効果

を發揮するほどの濃度がウイルス増殖部位で維持されたとは考え難いことから、免疫機能刺激効果が生体での有効性に寄与しているのではないかと推察して、この点を検討した。その結果、マクロファージの貪食能やNK活性の刺激効果が認められ、自然免疫系に影響を及ぼすことが明らかになった。さらにM-FUの経口投与時に、HSV-1感染マウスにおけるCTL活性の増強が認められ、中和抗体価の上昇(Fig. 2)にもみられるように全身性の獲得免疫機能が高められた。

M-FUは、HSV-1感染時だけでなく、最近話題になっているA型インフルエンザウイルスを感染させたマウスにおいても有効であることが、体内のウイルス量の減少やウイルス特異的抗体量の増加などの点から確認できた(未発表データ)。特に、粘膜から分泌されるIgA抗体の産生にも影響することから、M-FUを含めた多糖類は、広く呼吸器感染症に応用できる可能性があるかと推察される。このことに関連して、HCVの場合にも、リコンビナントE1エンベロープ糖タンパク質を用いて慢性的感染者を免疫すると、抗HCV抗体価が上昇するとの報告があり、免疫機能を刺激することによってHCVの増殖を抑制できる可能性がある。²³⁾

このような免疫機能に対する多糖体の作用がどのようなメカニズムで起こるのかについては、現時点では明確な解答が得られていないが、1つの可能性として腸管免疫系の関与が考えられ、現在検討中である。

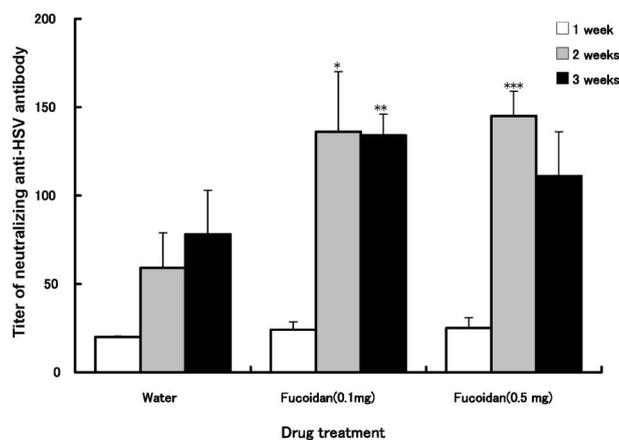


Fig. 2. Neutralizing Antibody Production for HSV-1 by Treatment with Fucoidan

Water or fucoidan (0.1 mg or 0.5 mg/day) was administered perorally for 3 weeks. Antibody titers in the sera of mice were determined by 50% plaque reduction assay at 1, 2 and 3 weeks after immunization with HSV-1 subcutaneously. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs. control (water).

ある。

5. 総括

インターフェロンとリバビリンを併用する現行のC型肝炎ウイルス感染症の治療法は、効果が限定され、重大な副作用がみられるため、新規のHCV増殖阻害剤の開発が強く望まれている。最近になって、重要なウイルス酵素の構造や機能が解明されてきたことや、HCVレプリコンの開発が進んだことから、特異性の高い抗ウイルス活性化化合物の開発の可能性も高まっている。HCVの増殖過程においては、エンベロープの糖タンパク質を用いて宿主細胞へ吸着・侵入し、RNAゲノムが細胞質でmRNAとして機能し、合成されたlong polyproteinが宿主及びウイルス由来のプロテアーゼによって切断された後、子孫ウイルスが放出される。

われわれは、約20年間、多数の天然素材について抗ウイルス活性物質を探索してきた。抗ウイルス活性作用標的は、ウイルスの宿主細胞への結合から子孫ウイルスの放出に至るまでのすべてのlife cycleが該当すると考えられ、いくつかのユニークな作用を示す物質を得ている。これまでの知見の中で抗HCV活性評価に応用し得る例としては、①ウイルスの吸着・侵入段階を干渉するアニオン性物質(酸性多糖体)、②細胞からの子孫ウイルス放出を阻止する低分子物質、③ウイルス粒子の感染力を消失させる殺ウイルス活性物質、④ウイルス粒子の成熟を阻害する糖鎖合成阻害物質、⑤生体の感染防御機能刺激物質などが挙げられる。これらの作用標的や作用物質はいずれも、新規性が高く、薬剤耐性ウイルスを生じ難いと考えられ、HCV増殖系での有効性を評価する価値があると思われる。

REFERENCES

- 1) Lang L., *Gastroenterology*, **132**, 2282–2283 (2000).
- 2) Marthy J. E., Ma S., Compton T., Lin K., *Antimicrob. Agents Chemother.*, **52**, 3267–3275 (2008).
- 3) Wyles D. L., Kaihara K. A., Schooley R. T., *Antimicrob. Agents Chemother.*, **52**, 1862–1864 (2008).
- 4) Manns M. P., Foster G. R., Rockstroh J. K., Zeuzen S., Zoulim F., Houghton M., *Nat. Rev. Drug Discov.*, **6**, 991–1000 (2004).

- 5) Hayashi K., Hayashi T., Morita N., Kojima I., *Phytother. Res.*, **7**, 76–80 (1993).
- 6) Hayashi T., Hayashi K., Maeda M., Kojima I., *J. Nat. Prod.*, **59**, 83–87 (1996).
- 7) Lee J.-B., Hayashi T., Hayashi K., Sankawa U., Maeda M., Nemoto T., Nakanishi H., *J. Nat. Prod.*, **61**, 1001–1004 (1998).
- 8) Hayashi K., Hayashi T., Kojima I., *AIDS Res. Hum. Retroviruses*, **12**, 1463–1471 (1996).
- 9) Hayashi K., Hamada J., Hayashi T., *Phytother. Res.*, **10**, 233–237 (1996).
- 10) Hoshino T., Hayashi T., Hayashi K., Hamada J., Lee J.-B., Sankawa U., *Biol. Pharm. Bull.*, **21**, 730–734 (1998).
- 11) Srisomporn P., Hayashi K., Lee J.-B., Sankawa U., Hayashi T., *Chem. Pharm. Bull.*, **49**, 484–485 (2001).
- 12) Lee J.-B., Hayashi K., Hashimoto M., Nakano T., Hayashi T., *Chem. Pharm. Bull.*, **52**, 1091–1094 (2004).
- 13) Kanekiyo K., Lee J.-B., Hayashi K., Takenaka H., Hayakawa Y., Endo S., Hayashi T., *J. Nat. Prod.*, **68**, 1037–1041 (2005).
- 14) Kanekiyo K., Hayashi K., Takenaka H., Lee J.-B., Hayashi T., *Biol. Pharm. Bull.*, **30**, 1573–1575 (2007).
- 15) Lee J.-B., Hayashi K., Hirata M., Kuroda E., Suzuki E., Kubo Y., Hayashi T., *Biol. Pharm. Bull.*, **29**, 2135–2139 (2006).
- 16) Rattanathongkom A., Lee J.-B., Hayashi K., Sripanidkulchai B.-O., Kanchanapoom T., Hayashi T., *Planta Med.*, **75**, 829–835 (2009).
- 17) Hayashi K., Hayashi T., *Antiviral Chem. Chemother.*, **7**, 79–85 (1996).
- 18) Hayashi K., Lee J.-B., Maitani Y., Toyooka N., Nemoto H., Hayashi T., *J. Gene Ther.*, **8**, 1056–1067 (2006).
- 19) Hayashi K., Hayashi T., Otsuka H., Takeda Y., *J. Antimicrob. Chemother.*, **39**, 821–824 (1997).
- 20) Hayashi K., Kawahara K., Naki C., Sankawa U., Seto H., Hayashi T., *J. Antimicrob. Chemother.*, **46**, 181–189 (2000).
- 21) Hayashi K., Kawauchi M., Nakai C., Sankawa U., Seto H., Hayashi T., *Antiviral Chem. Chemother.*, **12**, 51–59 (2001).
- 22) Hayashi K., Nakano T., Hashimoto M., Kanekiyo K., Hayashi T., *Int. Immunopharmacol.*, **8**, 109–116 (2008).
- 23) Leroux-Roels G., Depla E., Hulstaert F., Tobback L., Dincq S., Desmet J., Desombere I., Maertens G., *Vaccine*, **22**, 3080–3086 (2004).