

厚生省科学研究費補助金

平成10年度

新興・再興感染症研究事業

デングウイルス及び日本脳炎ウイルスに対する  
新型ワクチンの開発に関する研究 (H10-新興-41)

研究報告書

平成11年3月

主任研究者 倉根一郎

(国立感染症研究所)

## 目 次

1. デングウイルス及び日本脳炎ウイルスに対する新型ワクチンの開発に関する研究・・・1  
主任研究者：倉根一郎（国立感染症研究所 ウイルス第一部）
2. 日本脳炎 DNA ワクチン免疫マウスにおける防御機構：攻撃後の2次免疫応答・・・10  
分担研究者：小西英二（神戸大学医学部 医療基礎学講座）
3. ヒト用候補日本脳炎 DNA ワクチンの開発及びマウスにおける実験的評価・・・25  
分担研究者：小西英二（神戸大学医学部 医療基礎学講座）
4. pNGV14a ベクターを用いた日本脳炎 DNA ワクチンによるキラーT細胞の誘導・・・31  
分担研究者：高崎智彦（国立感染症研究所 ウイルス第一部）
5. ブタにおける日本脳炎 DNA ワクチンの免疫誘導能・・・35  
分担研究者：小西英二（神戸大学医学部 医療基礎学講座）
6. 日本脳炎ウイルス細胞外粒子 pr/M 蛋白切断部位における突然変異の導入・・・46  
分担研究者：小西英二（神戸大学医学部 医療基礎学講座）
7. サルにおける日本脳炎ウイルス感染に関する研究・・・52  
分担研究者：山田章雄（国立感染症研究所 霊長類センター）
8. デングウイルス非構造タンパク NS3 遺伝子を組み込み DNA ワクチンの作製・・・55  
分担研究者：山岡政興（兵庫県立衛生研究所）
9. デングDNAワクチンの開発：マウスにおける中和抗体の誘導・・・60  
分担研究者：小西英二（神戸大学医学部 医療基礎学講座）
10. デングウイルス感染症の診断法の確立（2）・・・66  
分担研究者：山田堅一郎（国立感染症研究所 ウイルス第一部）
11. マウスユビキチン搭載プラスミドベクターの構築・・・72  
分担研究者：小西英二（神戸大学医学部 医療基礎学講座）

厚生科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）

総括研究報告書

デングウイルス及び日本脳炎ウイルスに対する新型ワクチンの開発に関する研究

主任研究者 倉根 一郎（国立感染症研究所 ウイルス第一部 部長）

研究要旨：本研究は再興感染症として世界的に大きな問題となっており、日本においても問題になりつつあるウイルス感染症であるデング熱・デング出血熱と日本脳炎の防御対策を主題としたものである。（１）日本脳炎ウイルスの防御における中和抗体及びCTLの役割を明らかにする目的で、免疫マウスにおける攻撃後の2次免疫応答を調べた。日本脳炎ウイルスPrM, E遺伝子をふくむDNAワクチンpcJEMEにより1回または2回免疫したICRマウスの多くは、攻撃後4日目に1:80以上の中和抗体価が誘導され、すべてのマウスがJEV北京P3株による攻撃に対して生残した。攻撃4日後に採取された抗体を移入することにより部分防御がもたらされた。以上の結果により、pcJEME免疫マウスにおける重要な防御因子は中和抗体であることが示された。（２）デング2型ウイルスNGC株のシグナル/prM/E遺伝子カセットをpcDNA3ベクターに組込むことにより作製したプラスミド（pcD2ME）は、マウスにおいて中和抗体及びデング2型ウイルス特異的な記憶B細胞を誘導することが明らかにされた。（３）日本脳炎ウイルス（JEV）のシグナル、前駆膜（prM）及び外被膜（E）遺伝子からなるカセットをpcDNA3及びpNGVL4aベクターに組込んで作製したプラスミド（pcJEME及びpNJEME）は、ブタにおいて中和抗体、HAI抗体及び記憶B細胞を誘導することが明らかにされた。（４）日本脳炎ウイルス（JEV）に対するDNAワクチンの開発に向け、今年度はカニクイザルにおける日本脳炎ウイルス感染のモデルを確立するために、感染実験を行った。カニクイザルは日本脳炎ウイルスの経鼻接種に高い感受性を示し、ワクチンの有効性を示すための攻撃実験に有用であることが、明らかとなった。

分担研究者：

小西英二（神戸大学医学部 助教授）

山岡政興（兵庫県立衛生研究所 主任研究員）

山田章雄（国立感染症研究所 霊長類セ

ンター センター長）

中山幹男（国立感染症研究所 主任研究官）

山田堅一郎（国立感染症研究所 主任研

究官）

高崎智彦（国立感染症研究所 主任研究官）

#### A. 研究目的

当研究は再興感染症として世界的に大きな問題となっており、日本においても問題になりつつあるウイルス感染症であるデング熱・デング出血熱と日本脳炎の防御対策を主題としたものである。これらのウイルスに対して最も有効な防御対策はワクチンの開発であると考えられる。デングウイルス感染症の患者は全世界で年間約一億人と推定されている。近年、致命的なデング出血熱の増加と感染地域の拡大が大きな問題である。日本においては海外旅行者におけるデングウイルス感染症が大きな問題である。日本脳炎は致死率の高さから日本においても再度大きな問題となり得る疾患である。当研究の目的はデングウイルスや日本脳炎ウイルスに対する新しいタイプのワクチンの開発であり具体的には以下の目的を持つ。

(1) デングウイルスや日本脳炎ウイルスに対する防御免疫の解明、(2) 遺伝子組み換えによるワクチン、特に DNA ワクチンの開発、(3) 日本脳炎ウイルスワクチンやデングワクチンのデング出血熱病態形成への影響の解明。デングウイルスに対するワクチンは現在実用化されたものがなくワクチン開発は日本のみならず世界的に強く望まれている。また日本脳炎ワクチンに関しては、現在用いられている感染マウス脳由来不活化ワクチンに代わる、安価でより安全なワクチンが望まれている。当研究により、デングウイルスや日本脳炎ウイルスに対して高い防

御免疫誘導能を持ち、副作用がなく安全で安価なワクチンの開発を可能にする。さらに本研究で開発するワクチン作製法は、他のウイルスに対する新型ワクチン開発のモデルとなり得るものであり、国民の保健・医療・福祉の向上に大きく貢献する。

#### B. 研究方法

(1) 日本脳炎ウイルス遺伝子を含むプラスミドの構築と免疫原性の検討：新たに3種のプラスミドを作製した。シグナル及び prM（塩基番号 325-882）を含むプラスミド (pcJEprM)、E の前半（塩基番号 883-1599）を含むプラスミド (pcJEprM) 及び E の後半（塩基番号 1600-2382）を含むプラスミド (pcJEprM) である。4週令の ICR マウスをグループあたり5匹あるいは6週令の BALB/c マウスをグループあたり3匹用いて抗体及び防御免疫の誘導を調べた。また、6週令の BALB/c マウスをグループあたり2匹用いて CTL の誘導を調べた。PBS で希釈した DNA 溶液の 100ul を筋肉内に1回または2週間隔で2回接種することによりマウスを免疫した。免疫原としてマウスあたり 100ug あるいは 10ug の pcJE ME、100ug の pcJEprM、pcJEE1/2 あるいは pcJEE2/2 を用いた。最終の免疫後、2-4週目に 10,000LD50 の北京 P3 株を腹腔内に接種することにより攻撃した。

(2) デング 2 型ウイルス遺伝子を含むプラスミドの構築と免疫原性の検討：デング 2 型ウイルス NGC 株からクローン化した cDNA を鋳型にして 2 種のプライマーを用いて PCR を行い、シグナル/prM/E

遺伝子を増幅した。増幅された遺伝子を、pcDNA3 ベクター (Invitrogen) の EcoRV/XhoI サイトに挿入して pcD2ME を作製した。シーケンシングにより、シグナル/prM/E 遺伝子は報告されている NGC 株の塩基配列とはわずかに異なるが、同じくデング 2 型の PU0-218 株とはよく一致した。デングウイルス 2 型 NS3 蛋白を発現するプラスミドも同様に構築した。

6 週令の雄 BALB/c マウスをグループあたり 3 から 5 匹用いた。免疫原は pcD2ME (1ug、10ug あるいは 100ug) あるいは pcDNA3 ベクター (100ug) であった。これらの免疫原を、マウスに 2 週間隔で 2 回から 3 回筋肉内接種した。また、 $1 \times 10^5$  PFU の NGC 株を 2 週間隔で 2 回腹腔内接種した。2 から 3 週後に眼窩静脈叢より採血し、血清を分離した。血清はグループごとにプールした後、試験に用いた。攻撃実験は、グループあたり 4 から 5 匹の免疫マウスを用いて  $3 \times 10^5$  PFU の NGC 株を腹腔内接種した。攻撃前及び攻撃後 4、8、21 日目に採血し、マウス個体別に中和抗体を測定した。

(3) マウス移入実験：移入に用いる血清は、pcJEME 免疫マウスの攻撃前、攻撃後 4 日目または 21 日目の血清、あるいは非免疫マウスの攻撃後 4 日目の血清である。これらの血清をプールし、イムグロブリン分画を、攻撃後 2 日目のマウスに移入した。移入後 19 日間、すなわち攻撃後 21 日間生死を観察した。

(4) ブタ免疫実験：8-12 週令の去勢雄または雌のミニブタ (ヨークシャー種) を用いた。pcJEME による HAI 抗体の誘導を調べた実験及びジーンガンによる

投与と筋肉内投与を比較した実験では、1 頭または 2 頭のブタに 1 頭あたり 400ug (筋肉内) または 2.6ug (ジーンガン) の pcJEME を 5 週間隔 (筋肉内) または 4 週間隔 (ジーンガン) で 2 回接種した。対照として、400ug の pcDNA3 ベクターを 5 週間隔で 2 回筋肉内接種した。ジーンガンによる接種は、DNA を吸着させた金粒子を 6 ショット、ブタ腹部の皮膚に投与することにより行った。攻撃実験においては 450ug の pNJEME を筋肉内に 3 週間隔で 2 回接種後 14 週目のブタ 5 頭、及び 1ml の不活化ワクチンを皮下に 2 週間隔で 2 回接種後 15 週目のブタ 5 頭を攻撃実験に用いた。それぞれのグループにおいて、3 頭に 2ml の不活化ワクチンを、また 2 頭に 2ml の生理食塩水を皮下に接種した後、2 日目、4 日目、及び 8 日目に採血し、HAI 抗体価を測定した。

(5) 日本脳炎ウイルスによるサルへの感染：5 頭のカニクイザルに日本脳炎ウイルスを 0.5 ml ずつ経鼻接種し 2-3 日おきに体温測定を行うと同時に臨床経過を観察した。観察期間中に瀕死となった個体は麻酔下で安楽殺した。観察期間内に死亡したものも含めて病理学的に検索した。

## C. 結果

(1) 日本脳炎ウイルス遺伝子を含むプラスミドの構築と免疫原性の検討

pcJEME 免疫マウスはすべてが攻撃前に 1:10 から 1:20 の中和抗体価を有しており、攻撃後 4 日目に 1:160 から 1:320、8 日目に 1:320 から 1:1280 に上昇し、すべてのマウスが生残した。21 日目の中和

抗体価は 8 日目の抗体価とほぼ同じであった。一方、pcDNA3 ベクター接種マウスは攻撃前に中和抗体は検出できず、4 日目に最大で 1:10、8 日目に最大 1:20 を示したにとどまり、すべてのマウスが 10 日以内に死亡した。4 週令の ICR マウスを 100ug あるいは 10ug の pcJEME または PBS を 1 回筋肉内接種した後、4 週目に 10,000LD50 の北京 P3 株により攻撃した。生残したのは 100ug の pcJEME 免疫群の 4 匹のみであった。攻撃前に中和抗体が検出された ICR マウスは 100ug 免疫群 5 匹中 1 匹のみであった。攻撃後には 100ug 接種群のマウス 3 匹に中和抗体の上昇がみられ、4 日目に 1:80 以上の抗体価を示し、21 日間生残した。IgG クラスの抗 prM/E 抗体は概ね中和抗体価と平行して上昇した。また IgM クラスの抗 prM/E 抗体は大部分のマウスにおいて攻撃後 4 日目に最大値となった。10ug 免疫群及び PBS 免疫群の 10 匹のうち 5 匹が攻撃後 4 日目に 0.2 以上の値を示した。100ug 免疫群において唯一死亡したマウスも 4 日目に 0.2 以上の値を示し、このマウスが 100ug の pcJEME の 1 回接種によって有効に免疫されなかったことを示唆した。

抗 NS1 抗体価の推移は、攻撃ウイルスの複製の指標となる。ほとんどすべてのマウスにおいて抗 NS1 抗体価は観察期間中上昇し、特に数匹のマウスにおいては死の直前に急激な上昇が認められた。100ug 免疫群において攻撃後 4 日目に 1:20 しか中和抗体価を示さなかったが生残した 1 匹については、観察期間中低い抗 NS1 抗体価を示し、このマウスにおいては攻撃ウイルスが低いレベルでしか複

製しなかったことを示唆する。

攻撃後に誘導される中和抗体の役割を明確にする目的で、移入実験を行った。移入した血清の由来、中和抗体のレベル及び生残数を表 2 に示す。攻撃後 4 日目及び 21 日目の抗体移入により、それぞれ 10 匹中 3 匹及び 4 匹が生残した。一方、免疫マウスの攻撃前血清あるいは非免疫マウスの攻撃後の血清には移入による防御が認められなかった。

(2) デング 2 型ウイルス遺伝子を含むプラスミドの構築と免疫原性

pcD2ME を BALB/c マウスに 2 週間隔で 2 回から 3 回 (6、8、10 週令時) 筋肉内接種した。100ug の pcD2ME により 2 回免疫したマウスには、抗体価が 1:10 の中和抗体が誘導された。一方、1ug あるいは 10ug の pcD2ME を 2 回免疫したマウスには、検出できる中和抗体は誘導されなかった。また、100ug の pcD2ME により 2 回免疫したマウスに誘導された抗体価 (1:10) は、3 回免疫により上昇しなかった。対照グループにおいては、100ug の pcDNA3 ベクターにより 2 回から 3 回免疫したマウスには中和抗体は誘導されず、NGC 株により 2 回免疫したマウスには、1:10 の中和抗体価が誘導された。免疫マウスを  $3 \times 10^5$  PFU の NGC 株により腹腔内接種した後の、中和抗体の推移を調べた。最初の実験では、100ug の pcD2ME により 3 回免疫した 5 匹のマウスの内 1 匹に 1:10 の中和抗体価が攻撃前に認められた。攻撃後、すべての免疫マウスに 1:40 以上の中和抗体価が 4 日目に、また 1:80 以上の中和抗体価が 8 日目に認められた。この中和抗体価の上昇は、2 次免

疫応答を示す。中和抗体価は 21 日目まで維持された。一方 100ug の pcDNA3 ベクターにより 2 回あるいは 3 回免疫した 2 匹のマウスにおいては、攻撃後 4 日目及び 8 日目に中和抗体は検出されなかった。この内 1 匹に攻撃後 21 日目に 1:20 の中和抗体価が検出された。おそらく攻撃ウイルスに対する抗体応答と考えられる。

2 回目の実験においては、グループあたり 4 匹のマウスを用いて 1ug、10ug あるいは 100ug の pcD2ME による 2 回の免疫が、2 次抗体応答に及ぼす影響を調べた。攻撃前には、100ug の pcD2ME 免疫群の 2 匹に、中和抗体が認められた。攻撃後、100ug の pcD2ME 免疫群においては、4 日目及び 8 日目に中和抗体価が 1:40 または 1:80 にまで上昇したが、1ug あるいは 10ug の pcD2ME 免疫群においては、4 日目には中和抗体は検出されず、8 日目に最大 1:20 の中和抗体価を示したにとどまった。100ug の pcDNA3 ベクターにより 2 回免疫したマウス群においては、攻撃後 4 日目及び 8 日目に中和抗体は検出されなかった。以上の結果は、pcD2ME がマウスに、デング 2 型ウイルス特異的な記憶 B 細胞及びヘルパー T 細胞を誘導したことを示す。

#### (4) DNA ワクチンによるブタ免疫実験

450ug の pcJEME を筋肉内接種して得られた中和抗体価及び HAI 抗体価の推移を、同じドーズの pcJEME を皮内接種して得られた抗体価の推移と比較した。皮内接種グループにおける中和抗体価は、初回接種後に $<1:10$ 、追加接種後 1 週目に 1:40

であり、また HAI 抗体価は、初回接種後に $<1:10$  から 1:10、追加接種後 1 週目に 1:40 であった。中和抗体及び HAI 抗体共に 100ug の pcJEME を筋肉内接種したブタに認められた抗体価の推移とほぼ一致した。この結果は、450ug の pcJEME を筋肉内接種したブタに誘導された抗体は、皮内接種により誘導された抗体より高いレベルであり、投与ルートによる抗体誘導能の違いを示す。

450ug の pNJEME を筋肉内接種することによりブタに誘導された中和抗体及び HAI 抗体は、450ug の pcJEME を筋肉内接種して得られた中和抗体及び HAI 抗体と同等であった。なお、対照として用いた不活化ワクチンの 2 回接種により 1:10 の HAI 抗体価が認められたが、中和抗体は検出されなかった。また、5 頭における抗体価の個体間変動は、中和抗体、HAI 抗体共いずれの接種群においても最大で 4 倍または 8 倍であった。

#### (3) 日本脳炎ウイルスによるサル感染

日本脳炎ウイルス (JEV) に対する DNA ワクチンの開発に向け、今年度はカニクイザルにおける日本脳炎ウイルス感染のモデルを確立するために、感染実験を行った。3 株の JEV をカニクイザルに経鼻接種したところ、いずれの株を接種したサルにおいても感染後 12-15 日に全てのサルが衰弱、振戦などの症状を呈し日本脳炎として典型的な症状を呈した。病理学でときには、すべての個体において日本脳炎ウイルスによると考えられる脳脊髄炎が認められた。詳細には、前例で大脳皮質、視床、中脳の黒質、赤核、橋等に神経細

胞の変性や壊死がみとめられた。免疫組織学的に日本脳炎ウイルス抗原が、神経細胞細胞質内に検出された。

#### D. 考察

本研究により、pcJEME 免疫マウスにおける重要な防御因子は、攻撃後に誘導される中和抗体であることが証明された。このマウスモデルにおいては、防御されたマウスにおいても抗 NS1 抗体が検出され、たとえ攻撃前に中和抗体が存在しても、攻撃ウイルスによる感染・複製が起こったことを示す。すなわち、中和抗体による sterile immunity の成立は困難であることを示唆する。しかし、免疫マウスにおける記憶 B 細胞やヘルパー T 細胞の存在により、攻撃ウイルスの進入に即座に应答して中和抗体価を上昇させることにより、発病や死を防御すると考えられる。pcD2ME により免疫したマウスにおいて、中和抗体及びデング 2 型ウイルス特異的な記憶 B 細胞が誘導されることが明らかにされた。しかし、誘導された中和抗体は低レベルであり、その抗体価は検出限界価 (1:10) であった。低レベルの中和抗体誘導は日本脳炎に対する候補 DNA ワクチンである pcJEME においても認められた。デングワクチンの防御効力を調べるために、従来免疫マウスに攻撃ウイルスを脳内接種する方法が一般的に用いられてきた。末梢からの攻撃は、ウイルスの 1 次増殖及び 2 次増殖をもたらすと考えられるが、デングの場合通常この接種経路で病気や死を引き起こすことは不可能とされる。pcD2ME 免疫マウスにおいては、攻撃後 4 日目及び 8 日目に中和抗体価の上昇が観察されたが、非

免疫マウスには観察されなかった。デングウイルスに対する防御における中和抗体の重要性は、中和活性を持つモノクローナル抗体が移入によりマウスを防御することにより証明されている。我々の日本脳炎モデルにおいて、DNA ワクチン (pcJEME) により免疫されたマウスが攻撃から防御されるのは、攻撃ウイルスに対する 2 次免疫応答により中和抗体価が急激に上昇するためであると考えている。

日本脳炎ウイルスに対する DNA ワクチンの有効性をサルにおいて明らかにするための前段階として、カニクイザルの日本脳炎ウイルスに対する感受性を調べたところ、経鼻感染により、カニクイザルは脳脊髄炎を発症し、斃死することが明らかとなった。現在免疫学的、ウイルス学的パラメーターを測定中ではあるが、DNA ワクチンの効果判定を行ううえで極めて重要なサルにおける攻撃実験が可能であることが明らかになった。従って、このシステムを用いて、試作 DNA ワクチンの有効性試験を行う予定である。

#### E. 結論

(1) pcJEME 免疫マウスにおける重要な防御因子は、攻撃後に誘導される中和抗体であることが証明された。(2) デング 2 型ウイルス NGC 株のシグナル/prM/E 遺伝子カセットを pcDNA3 ベクターに組込むことにより作製したプラスミド (pcD2ME) は、マウスにおいて中和抗体及びデング 2 型ウイルス特異的な記憶 B 細胞を誘導することが明らかにされた。(3) 日本脳炎ウイルス (JEV) のシグナル、前駆膜 (prM) 及び外被膜 (E) 遺



伝子からなるカセットを pcDNA3 及び pNGVL4a ベクターに組込んで作製したプラスミド (pcJEME 及び pNJEME) は、ブタにおいて中和抗体、HAI 抗体及び記憶 B 細胞を誘導することが明らかにされた。

(4) カニクイザルは日本脳炎ウイルスの経鼻接種に高い感受性を示し、ワクチンの有効性を示すための攻撃実験に有用であることが、明らかとなった。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

Konishi E., Yamaoka M., Khin Sane Win, Kurane I., Takada K. and Mason P. W. : Anamnestic neutralizing antibody response is critical for protection of mice from challenge following vaccination with a plasmid encoding Japanese encephalitis virus premembrane and envelope genes. *Journal of Virology* in press.

Konishi E., Yamaoka M., Khin Sane Win, Kurane I. and Mason P. W. : Induction of protective immunity against Japanese encephalitis in mice by immunization with a plasmid encoding Japanese encephalitis virus premembrane and envelope genes. *Journal of Virology* 72, 4925-4930 (1998).

Konishi E., Kurane I., Mason P. W., Shope R. E. Kanesa-Thanan N., Smucny J. J., Hoke C. H. Jr. and Ennis F. A. : Induction of Japanese encephalitis

virus-specific cytotoxic T lymphocytes in humans by poxvirus-based JE vaccine candidates. *Vaccine* 16, 842-849 (1998).

Kurane, I., Zeng, L.-L., Brinton, M. A., and Ennis, F.A. : Definition of an epitope on NS3 recognized by human CD4+ cytotoxic T lymphocyte clones cross-reactive for dengue virus types 2, 3 and 4. *Virology*. 240 :169-174. 1998

Mathew, A., Kurane, I., Green, S., Stephens, H.A.F., Vaughn, D.W., Kalayanarooj, S., Suntayakorn, S., Ennis, F.A., and Rothman, A. : Predominance of CTL responses to serotype crossreactive epitopes on nonstructural protein following natural secondary dengue virus infection. *Journal of Virology* 72 :3999-4004. 1998

倉根一郎 : デング熱とデング出血熱 . "Emerging and Re-emerging Infectious Diseases" *Pharma Medica*. 16:55-60. 1998.

Aihara, H., Takasaki, T., Matsutani, T., Suzuki, R., and Kurane, I. : Establishment and characterization of Japanese encephalitis virus-specific, human CD4+ T cell clones : flavivirus cross-reactivity, protein recognition and cytotoxic activity. *Journal of Virology* 72 :8032-8036, 1998.

倉根一郎：日本脳炎ワクチン。化学療法の領域 14 :1963-1969, 1998.

Green, S., Vaughn, D.W., Kalayanarooj, S., Nimmannitya, S., Suntayakorn, S., Nisalak, A., Lew, R., Innis, B.L., Kurane, I., Rothman, A.L., and Ennis, F.A. : Early immune activation in dengue. *Journal of Infectious Diseases*. In press. 1999

Eshita, Y., Itoh, T., Surathin, K., Miyamura, K., Kanuangkit, S., Hasebe, F., Nawa, M., Chanyasanha, C., Anantapreecha, S., Saguawongse, S., Warachit, P., Sucharit, S., Chuananin, S., Sreeta, W., Rongsriyam, Y., Yamada, K., Agui, N., Fukuma, T. and Igarashi, A. : Behavior of dengue vector, *Aedes aegypti* and application of Olyset net, for its control in houses in an endemic area. In: *The 9th International Congress of Parasitology*, Tada, I., Kojima, S. and Tsuji, M. (Ed.), Monduzzi Editore, Bologna, Italy, : 1049-1053, 1998.

Kurane I., and Takasaki, T. : Dengue virus-specific T lymphocyte responses and the role of T lymphocytes in the pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. *Japanese Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. In press, 1999.

Yamada, K., Takasaki, T., Nawa, M., and Kurane I. : Laboratory diagnosis of imported dengue cases. *Japanese Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. In press, 1999.

中山智祥、狩野信和、青井則子、渡邊英幸、遠藤守人、奥田直裕、高木浩人、松本紘一、渡辺吉康、大井洋之、小沢友紀雄、上松瀬勝男、矢内 充、山田堅一郎、倉根一郎：デング熱の一例—日大板橋病院初の報告—。日大医誌：58（2）：109-115, 1999.

Fukao, T., Hirano, A., Nakamura, K., Yamazaki, Y., Yamada, A., Tshita, H., Inoue, R., and Kondo, N. : Perinatal mumps associated with bronchiolitis and respiratory distress. *Eur. J. Pediatr.*, 157, 952-953, 1998

山田章雄：DNAワクチン、治療学、32, 1520-1523, 1998

Spaulding, A.C., Kurane, I., Ennis, F.A., and Rothman, A.L. : Analysis of murine CD8+ T cell clones specific for the dengue virus NS3 protein : flavivirus cross-reactivity and influence of the infecting serotype. *Journal of Virology*. 73 :398-403, 1999.

## 2. 学会発表

小西英二、山岡政興、倉根一郎：デング DNA ワクチンのマウスにおける免疫誘導能。第2回日本ワクチン学会学術集会

(1998)。

小西英二、山岡政興、高田和男、倉根一郎：日本脳炎 DNA ワクチンにより免疫したマウスにおける攻撃後の2次免疫応答。第46回日本ウイルス学会学術集会・総会(1998)。

高田和男、正木秀幸、高崎智彦、小西英二、高橋光雄、倉根一郎：日本脳炎ウイルス特異的マウスキラーT細胞が認識するE蛋白上のエピトープの同定。第46回日本ウイルス学会学術集会・総会(1998)。

Takada K., Masaki, H., Takahashi, M., Konishi, E., Kurane I., : Definition of an epitope on E protein recognized by Japanese encephalitis virus-specific, murine CD8+ cytotoxic T lymphocytes. The 32nd Joint Working Conference on Viral Diseases. US-Japan Cooperative Medical Science, 1998.

Aihara, H., Takasaki, T., Matsutani, T., Suzuki, R., Kurane, I.: Japanese encephalitis virus-specific, human CD4+ T lymphocyte clones: virus specificity, protein recognition and cytotoxic activity. The 32nd Joint Working Conference on Viral Diseases. US-Japan Cooperative Medical Science, 1998.

Konishi, E., Yamaoka M., Khin Sane Win,

Kurane I., Takada K., Mason P. W.: Secondary neutralizing antibody responses are a critical factor for protection in mice immunized with a plasmid encoding Japanese encephalitis virus premembrane and envelope genes. The 32nd Joint Working Conference on Viral Diseases. US-Japan Cooperative Medical Science, 1998.

山田堅一郎、江下優樹、長谷部 太、中山幹男、名和 優、倉根一郎、五十嵐章：RT-PCR法を用いた媒介蚊内におけるデングウイルス遺伝子の検出。第33回日本脳炎ウイルス生態学研究会、1998。

江下優樹、Surathin, K., 伊藤高明、宮村紀久子、Kanungkid, S., 長谷部 太、名和 優, Chanyasanha, C., Anantapreech, S., Saganwongse, S., Warachit, P., Sucharit, S., Chuananon, S., Sreeta, W., Rongsriyam, Y., 山田堅一郎、福間利英、五十嵐 章：デング流行地においてオリセットネットを用いた人家内のネッタイシマカ防除。第33回日本脳炎ウイルス生態学研究会、1998。

名和 優、山田堅一郎、倉根一郎：IgM-ELISAを用いたデング輸入感染例の血清診断。第5回トガ、フラビ、ペスチウイルス研究会。1998。

山田堅一郎：輸入デングウイルス感染症の現状とその検査・診断体制。第39回日本熱帯医学会大会、1998。

## 分担研究報告書

### 日本脳炎 DNA ワクチン免疫マウスにおける防御機構： 攻撃後の 2 次免疫応答

分担研究者 小西英二（神戸大学医学部医療基礎学講座）  
共同研究者 山岡政興（兵庫県立衛生研究所）  
高田和男（近畿大学医学部神経内科学講座）  
倉根一郎（国立感染症研究所ウイルス 1 部）  
Peter W. Mason（米国ブラムアイランド動物病センター）

**研究要旨** 日本脳炎ウイルス（JEV）前駆膜（prM）及び外被膜（E）遺伝子を組込んだプラスミド（pcJEME）は、マウスに防御免疫を誘導することをすでに報告した。この系では細胞障害性 T リンパ球（CTL）は検出されるものの、中和抗体は低いあるいは検出レベル以下しか誘導されない。本研究では、防御における中和抗体及び CTL の役割を明らかにする目的で、免疫マウスにおける攻撃後の 2 次免疫応答を調べた。100ug の pcJEME により 1 回または 2 回免疫した ICR マウスの多くは、攻撃後 4 日目に 1:80 以上の中和抗体価が誘導され、すべてのマウスが 10,000LD<sub>50</sub> の JEV 北京 P3 株による攻撃に対して生残した。10ug の pcJEME または PBS を接種したマウスのすべては攻撃後 4 日目に最大 1:20 の中和抗体価しか示さず、死亡した。プライマリー CTL 活性は攻撃後 4 日目に認められた。prM/E 遺伝子カセットのサブセットを組込んだプラスミドで免疫することにより、CTL エピトープが E の前半部分に存在することが明らかにされたが、このエピトープが誘導する CTL は防御をもたらすには不十分であることも示された。攻撃 4 日後に採取された抗体を移入することにより部分防御をもたらされた。以上の結果により、pcJEME 免疫マウスにおける重要な防御因子は、攻撃後に誘導される中和抗体であることが証明された。

#### A. 研究目的

日本脳炎に対する防御において重要な役割を果たすと考えられているのは 2 つの因子、すなわち中和抗体と細胞障害性 T リンパ球 (CTL) である。マ

ウスモデルにおいて、いずれも移入により致死量の攻撃から防御することが証明されている。回復期の日本脳炎患者には高いレベルの中和抗体及び CTL が認められる。しかし、この 2 つ

の因子のどちらがより深く防御に関わっているのかは明らかでない。

日本脳炎ウイルス (JEV) 中山株の前駆膜 (prM) のシグナル配列、prM 及び外被膜 (E) 遺伝子を組込んだプラスミド (pcJEME) は、マウスに中和抗体及び記憶CTLを誘導し、致死量のウイルスによる攻撃から防御した (昨年度の本研究報告に記載)。この実験系においては、記憶CTLは検知されるものの、誘導される中和抗体価は低く、検出レベル以下のマウスにおいても防御が認められた。したがって、pcJEMEによる免疫は、防御機構を解明するために適したマウスモデルを提供すると考えられる。今回、防御における中和抗体及びCTLの役割を明らかにする目的で、免疫マウスにおける攻撃後の2次免疫応答を調べた。

## B. 研究方法

**プラスミド** : pcDNA3ベクターにJEVのシグナル、prM及びE遺伝子カセットを組み込んだpcJEMEの作製は昨年度の本研究報告に記載した。同様の手法を用いて、本研究において新たに3種のプラスミドを作製した。シグナル及びprM (塩基番号325-882) を含むプラスミド (pcJEprM)、Eの前半 (塩基番号883-1599) を含むプラスミド (pcJEprM) 及びEの後半 (塩基番号1600-2382) を含むプラスミド (pcJEprM) である。いずれのプラスミドもJEV遺伝子が正しく組み込まれたことをシーケンシングにより確認した。また、プラスミドDNAはキアゲンキットを用いて精製した。

**ウイルス** : JEV中山株を中和試験及び脾臓細胞を刺激するために用いた。またJEV北京P3株をマウスの攻撃に用いた。CTL試験の標的細胞を感染させるために用いた組換えワクシニア

ウイルスは、vP555 (prM、E、NS1発現)、vP658 (E、NS1発現)、vP829 (prM、E発現) 及びこれらの親株であるvP410であった。VP829及びvP410は酵素抗体法の抗原作製に、vP857 (E、NS1、NS2a発現) は抗NS1を測定するための免疫化学試験の抗原細胞作製に用いられた。

**マウス実験** : 4週令のICRマウスをグループあたり5匹あるいは6週令のBALB/cマウスをグループあたり3匹用いて抗体及び防御免疫の誘導を調べた。また、6週令のBALB/cマウスをグループあたり2匹用いてCTLの誘導を調べた。PBSで希釈したDNA溶液の100ulを筋肉内に1回または2週間隔で2回接種することによりマウスを免疫した。免疫原としてマウスあたり100ugあるいは10ugのpcJE ME、100ugのpcJEprM、pcJEE1/2あるいはpcJEE2/2を用いた。最終の免疫後、2-4週目に10,000LD<sub>50</sub>の北京P3株を腹腔内に接種することにより攻撃した。攻撃の2日前、及び攻撃後2, 4, 6, 8, 11, 14, 21日目に眼窩静脈叢より採血し、血清分離後抗体試験に供した。また、攻撃後の生死を21日間観察した。

**中和試験** : 90%ブランク減少法により血清中の中和抗体価を測定した。

**ELISA** : 細胞外粒子を抗原としたELISAにより、血清中のIgG及びIgMクラスの抗prM/E抗体を測定した。JEVのシグナル、prM、E遺伝子をコードした組換えワクシニアウイルスvP829によりHeLa細胞を感染した。20時間後に採取した培養液からポリエチレングリコールにより細胞外粒子を濃縮し、トリトンX-100により粒子を破壊した。これを抗原として感作したマイクロプレートを、100倍希釈の被検血清、アルカリフォスファターゼ標識抗マウスIgGあるいはIgM、そし

てパラニトロフェニールリン酸と反応させた。親株のワクシニアウイルスvP410により感染したHeLa細胞から上記の方法で部分精製した対照抗原を用いて得られたOD値との差をprM/Eに特異的な抗体値とみなした。

**免疫化学試験：**JEVのNS1蛋白を発現する組換えワクシニアウイルスvP857により感染したHeLa細胞を抗原として、免疫化学染色により血清中の抗NS1抗体価を測定した。96穴マイクロプレートに成育させた単層HeLa細胞をvP857により感染し、6時間後に固定した。2倍階段希釈の血清と反応させた後、ABC試薬及びVIP基質（ベクター社）を用いて抗体を検出した。細胞を染色させた血清の最高希釈倍数を抗体価とした。非免疫マウスの血清が10倍希釈において時折細胞を染色したが、20倍希釈においてはまったく染色しなかったため、1:20を抗体陽性の閾値とした。

**CTL試験：**vP829あるいはvP410により感染したP815細胞を標的細胞として<sup>51</sup>Crを用いた標準法によりCTL試験を行った。primary CTLはマウスから脾臓細胞を採取後 *in vitro* stimulationなしで測定した。また、記憶CTLは、JEVにより刺激した後に測定した。

**移入実験：**移入に用いる血清は、pcJEME免疫マウスの攻撃前、攻撃後4日目または21日目の血清、あるいは非免疫マウスの攻撃後4日目の血清である。これらの血清をプールし、イムノグロブリン分画を、攻撃後2日目のマウスに移入した。移入後19日間、すなわち攻撃後21日間生死を観察した。

## C. 研究結果

### 2回免疫マウスにおける攻撃後の抗

**体応答：**4週令のICRマウスをグループあたり5匹用いて、マウスあたり100ugのpcJEMEまたはPBSを1回筋肉内接種した後、4週目に10,000LD<sub>50</sub>の北京P3株により攻撃した。攻撃の2日前、及び攻撃後4、8、21日目に採血し、血清中の中和抗体を調べた（表1）。その結果、pcJEME免疫マウスはすべてが攻撃前に1:10から1:20の中和抗体価を有しており、攻撃後4日目に1:160から1:320、8日目に1:320から1:1280に上昇し、すべてのマウスが生残した。21日目の中和抗体価は8日目の抗体価とほぼ同じであった。一方、pcDNA3ベクター接種マウスは攻撃前に中和抗体は検出できず、4日目に最大で1:10、8日目に最大1:20を示したにとどまり、すべてのマウスが10日以内に死亡した。

21日目の生残マウスのすべてに抗NS1抗体が認められた。pcJEMEにはNS1遺伝子が含まれていないので、抗NS1の存在はマウスの体内で攻撃ウイルスが複製したことを示す。

**1回免疫マウスにおける攻撃後の抗体応答：**4週令のICRマウスをグループあたり5匹用いて、マウスあたり100ugあるいは10ugのpcJEMEまたはPBSを1回筋肉内接種した後、4週目に10,000LD<sub>50</sub>の北京P3株により攻撃した。攻撃の2日前、及び攻撃後2、4、6、8、11、14、21日目に採血し、血清中の中和抗体及び抗prM/E・抗NS1抗体を調べた。実験の結果、生残したのは100ugのpcJEME免疫群の4匹のみであった（図1）。攻撃前に中和抗体が検出されたICRマウスは100ug免疫群5匹中1匹のみであった（図2）。攻撃後には100ug接種群のマウス3匹に中和抗体の上昇がみられ、4日目に1:80以上の抗体価を示し、21日間生残した。残りの2匹は4日目に1:20の抗体価を示し1

匹は生残した。一方、10ug接種群そしてPBS接種群のマウスは、すべて中和抗体価1:20にとどまり21日以内に死亡した。

IgGクラスの抗prM/E抗体は概ね中和抗体価と平行して上昇した(図3)。またIgMクラスの抗prM/E抗体は大部分のマウスにおいて攻撃後4日目に最大値となった(図4)。10ug免疫群及びPBS免疫群の10匹のうち5匹が攻撃後4日目に0.2以上の値を示した。100ug免疫群において唯一死亡したマウスも4日目に0.2以上の値を示し、このマウスが100ugのpcJEMEの1回接種によって有効に免疫されなかったことを示唆した。

抗NS1抗体価の推移は、攻撃ウイルスの複製の指標となる(図5)。ほとんどすべてのマウスにおいて抗NS1抗体価は観察期間中上昇し、特に数匹のマウスにおいては死の直前に急激な上昇が認められた。100ug免疫群において攻撃後4日目に1:20しか中和抗体価を示さなかったが生残した1匹については、観察期間中低い抗NS1抗体価を示し、このマウスにおいては攻撃ウイルスが低いレベルでしか複製しなかったことを示唆する。

**CTL活性の攻撃後の上昇:** 6週令のBalb/cマウスをグループあたり2匹用いて、マウスあたり100ugのpcJEMEを1回筋肉内接種した後、3週目に攻撃し、4, 8, 14日目に脾臓を採取してプライマリーCTL活性を調べた(図6)。その結果、プライマリーCTL活性は、攻撃後4日目に検出された。

**prM/E遺伝子カセットのサブセットを含むプラスミドで免疫したマウスにおける攻撃後の免疫応答:** prM遺伝子またはE遺伝子の前半部、後半部を含むプラスミド(pcJEprM, pcJEE1/2, pcJEE2/2)を作製し、それぞれの

100ugで2回免疫(2週間隔)したマウスを、2回目の免疫後3週目に各グループ2匹から血清・脾臓を採取して抗体・記憶CTLを調べると共に、各グループ3匹のマウスに攻撃して21日間生死の観察を行った。CTL試験の結果を図7に、抗体試験及び防御試験の結果を図8に示す。pcJEprM、pcJEE1/2、pcJEE2/2により免疫したマウスには、中和抗体は検出されなかった。pcJEE1/2により免疫したマウスにのみ記憶CTLが検出された。この結果は、prM/E領域の中でEの前半部にCTLエピトープが存在することを示す。しかし、pcJEE1/2により免疫したマウスは攻撃の後にすべてが死亡し、このエピトープに対する記憶CTLの誘導が、致死量の攻撃に対する防御には不十分であることを示唆する。

**移入による受動防御:** 攻撃後に誘導される中和抗体の役割を明確にする目的で、移入実験を行った。移入した血清の由来、中和抗体のレベル及び生残数を表2に示す。攻撃後4日目及び21日目の抗体移入により、それぞれ10匹中3匹及び4匹が生残した。一方、免疫マウスの攻撃前血清あるいは非免疫マウスの攻撃後の血清には移入による防御が認められなかった。生残率は低い、10,000LD<sub>50</sub>の北京P3株による腹腔内接種がこの週令のマウスに100%の死亡をもたらすことから、この結果を部分防御と結論した。

#### D. 考察

本研究により、pcJEME免疫マウスにおける重要な防御因子は、攻撃後に誘導される中和抗体であることが証明された。このマウスモデルにおいては、防御されたマウスにおいても抗NS1抗体が検出され、たとえ攻撃前に中和抗体が存在しても、攻撃ウイルス

による感染・複製が起こったことを示す。すなわち、中和抗体によるsterile immunityの成立は困難であることを示唆する。しかし、免疫マウスにおける記憶B細胞やヘルパーT細胞の存在により、攻撃ウイルスの進入に即座に反応して中和抗体価を上昇させることにより、発病や死を防御すると考えられる。

感染マウスから得られたCTLの移入により防御が成立することが報告されている。しかし、E遺伝子前半部を含むプラスミドpcJEE1/2により免疫したマウスは防御されなかった。より多くのCTL、もしくはprM、E以外の領域に存在するCTLエピトープが防御に関係すると考えられる。

## E. 結論

pcJEMEがマウスに誘導する防御免疫の主要因子は、攻撃後に上昇する中和抗体であることが証明された。CTLも攻撃後に誘導されるが、防御をもたらすには不十分な量であった。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

Konishi E., Yamaoka M., Khin Sane Win, Kurane I., Takada K. and Mason P. W.: Anamnestic neutralizing antibody response is critical for protection of mice from challenge following vaccination with a plasmid encoding Japanese encephalitis virus premembrane and envelope genes. *Journal of Virology* in press.

Konishi E., Yamaoka M., Khin Sane Win, Kurane I. and Mason P. W.: Induction of protective immunity against Japanese encephalitis in mice by immunization with a plasmid encoding Japanese encephalitis virus

premembrane and envelope genes. *Journal of Virology* 72, 4925-4930 (1998).

Konishi E., Kurane I., Mason P. W., Shope R. E., Kanesa-Thanan N., Smucny J. J., Hoke C. H. Jr. and Ennis F. A.: Induction of Japanese encephalitis virus-specific cytotoxic T lymphocytes in humans by poxvirus-based JE vaccine candidates. *Vaccine* 16, 842-849 (1998).

### 2. 学会発表

小西英二、山岡政興、倉根一郎： Dengue DNAワクチンのマウスにおける免疫誘導能。第2回日本ワクチン学会学術集会（1998）。

小西英二、山岡政興、高田和男、倉根一郎：日本脳炎DNAワクチンにより免疫したマウスにおける攻撃後の2次免疫応答。第46回日本ウイルス学会学術集会・総会（1998）。

高田和男、正木秀幸、高崎智彦、小西英二、高橋光雄、倉根一郎：日本脳炎ウイルス特異的マウスキラーT細胞が認識するE蛋白上のエピトープの同定。第46回日本ウイルス学会学術集会・総会（1998）。

Konishi, E., Yamaoka M., Khin Sane Win, Kurane I., Takada K., Mason P. W.: Secondary neutralizing antibody responses are a critical factor for protection in mice immunized with a plasmid encoding Japanese encephalitis virus premembrane and envelope genes. The 32nd Joint Working Conference on Viral Diseases. US-Japan Cooperative Medical Science, 1998.



表 1. pcJEMEにより2回免疫したICRマウスにおける攻撃後の免疫応答

免疫原 <sup>b</sup>	マウス 番号	中和抗体価 <sup>a</sup>				抗NS1 抗体価 <sup>d</sup>	21日目の 生死 (死亡日)
		-2日目 <sup>c</sup>	4日目	8日目	21日目		
pcDNA3JEME	1	1:10	1:320	1:640	1:640	1:640	生残
	2	1:10	1:160	1:640	1:1280	1:640	生残
	3	1:10	1:160	1:320	1:640	1:320	生残
	4	1:20	1:160	1:640	1:640	1:320	生残
	5	1:10	1:160	1:1280	1:640	1:640	生残
pcDNA3	6	<1:10	1:10	NA	NA	NA	死亡 (7日目)
	7	<1:10	<1:10	1:10	NA	NA	死亡 (10日目)
	8	<1:10	1:10	1:20	NA	NA	死亡 (9日目)
	9	<1:10	1:10	NA	NA	NA	死亡 (7日目)
	10	<1:10	<1:10	NA	NA	NA	死亡 (6日目)

<sup>a</sup>90%プラーク減少を示した最高血清希釈倍数。

<sup>b</sup>100ugの各免疫原を5匹の雌ICRマウスに4及び6週令時に接種した後、8週令時に攻撃した。

<sup>c</sup>攻撃後の日数。「-2日目」は攻撃前2日目を示す。

<sup>d</sup>vP857-感染HeLa細胞を抗原として用いた免疫化学試験により求めた。

表 2. pcJEME免疫マウスにおいて攻撃後に産生された抗体の移入によりもたらされた防御

ドナーマウス		移入に用いた プール血清の	
免疫状態 <sup>a</sup>	採血日 <sup>b</sup>	中和抗体価	防御 <sup>c</sup>
免疫	0日目	1:10	0/10
免疫	4日目	1:320	3/10
免疫	21日目	1:1280	4/10
非免疫	4日目	1:10	0/10

<sup>a</sup>100ugのpcJEMEにより2週間隔で2回免疫した4週令の雌ICRマウスまたは非免疫マウスを用いた。

<sup>b</sup>血清を採取した日を攻撃後の日数で示す。8週令時にマウスは10,000LD<sub>50</sub>の北京P3株により攻撃した。「0日目」は攻撃直前に採取したことを示す

<sup>c</sup>生残マウス数/移入マウス数。

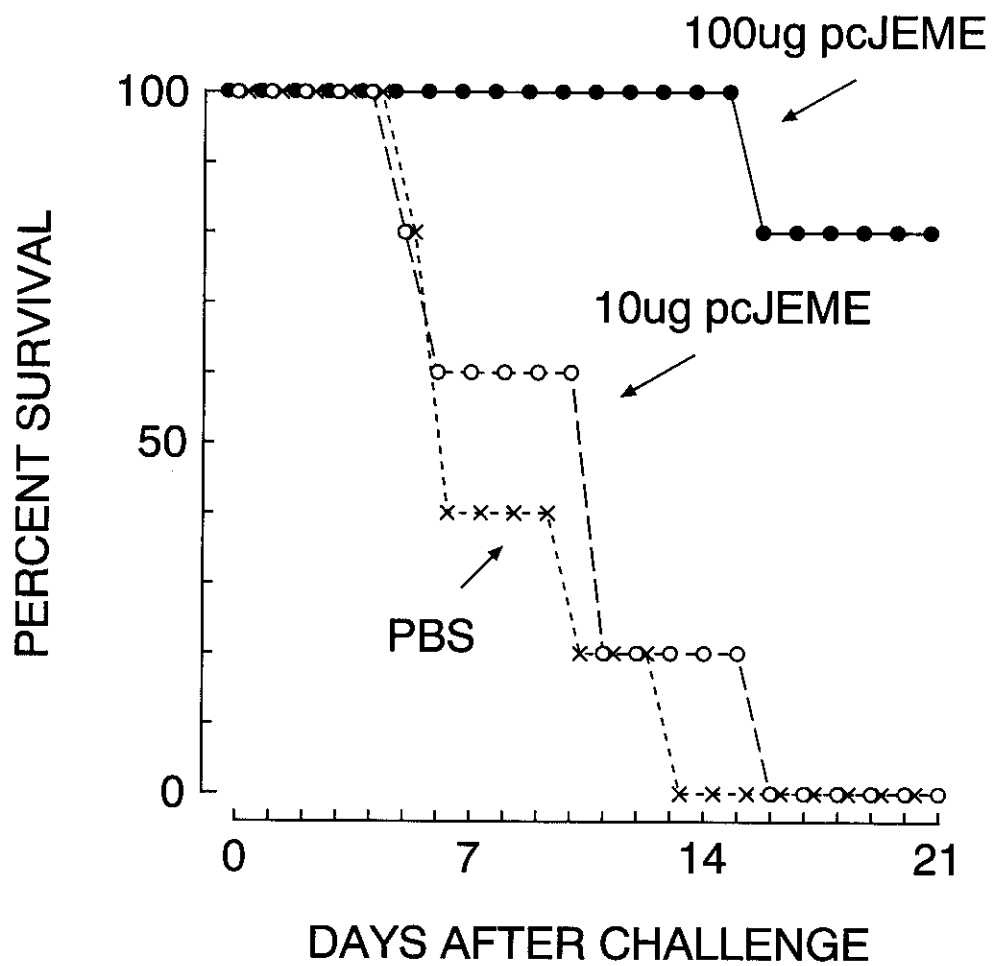


図1. 1回免疫マウスにおける攻撃後の生存曲線。1グループ5匹のICRマウスは、4週令時に100ugのpcJEME、10ugのpcJEMEあるいはPBSによる接種を行い、8週令時に攻撃した。

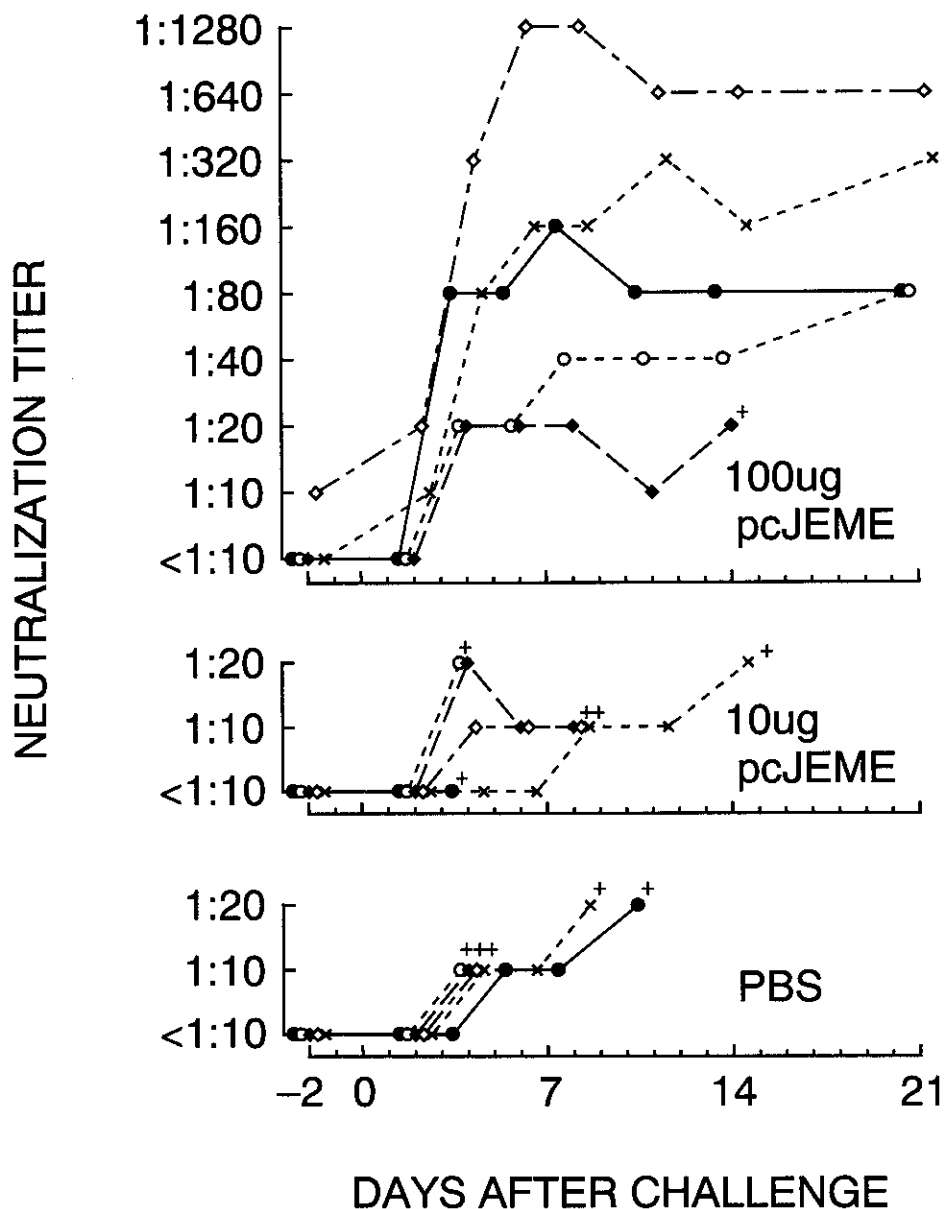


図2. 1回免疫マウスにおける攻撃後の中和抗体価の推移。1グループ5匹のICRマウスは、4週令時に100ugのpcJEME、10ugのpcJEMEあるいはPBSによる接種を行い、8週令時に攻撃した。攻撃2日前、攻撃後2、4、6、8、11、14及び21日に採取した血清を中和試験に供した。中和抗体価は、90%プラーク減少を示した最高血清希釈倍数で表した。なお図2から図5においては、各グループの同一マウスから得られたデータを一定の記号で表した。