

図3. 1回免疫マウスにおける攻撃後の、prM/Eに対するIgG抗体レベルの推移。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日目に採取した血清をELISA試験に供した。ELISAは、細胞外粒子を抗原として標準法により行い（「材料と方法」参照）、抗体レベルを相対値で表した。

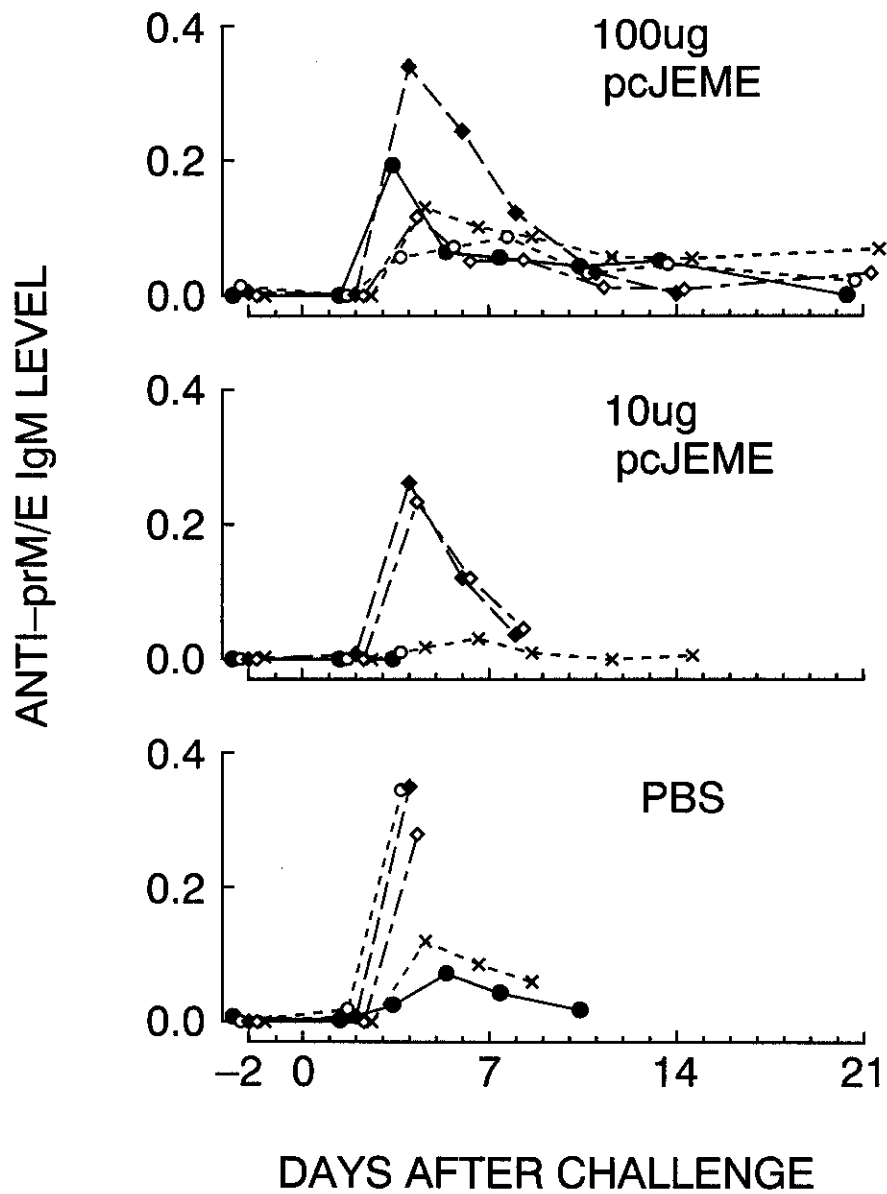


図4. 1回免疫マウスにおける攻撃後の、prM/Eに対するIgM抗体レベルの推移。
詳細は図3の説明を参照。

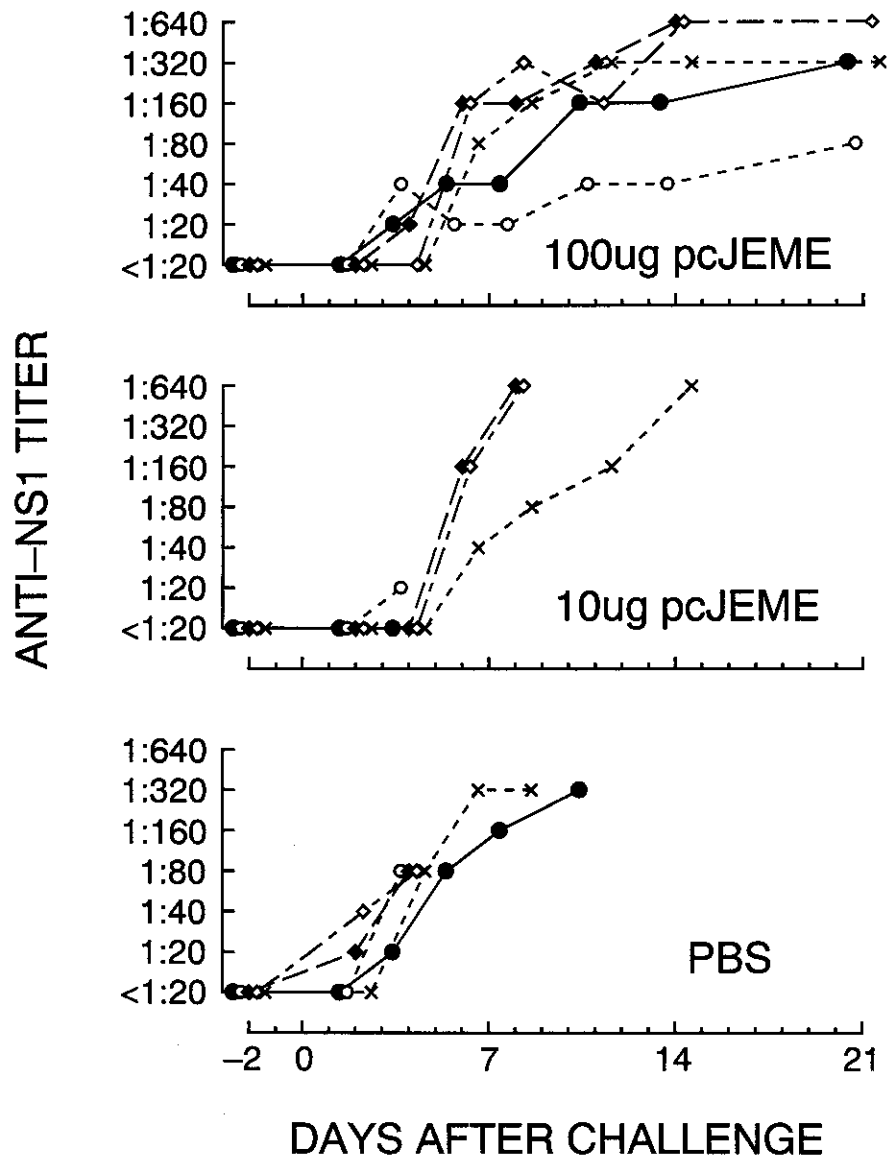


図5. 1回免疫マウスにおける攻撃後の、NS1に対する抗体レベルの推移。詳細は図3の説明を参照。抗体価は免疫化学試験により測定した（「材料と方法」参照）。

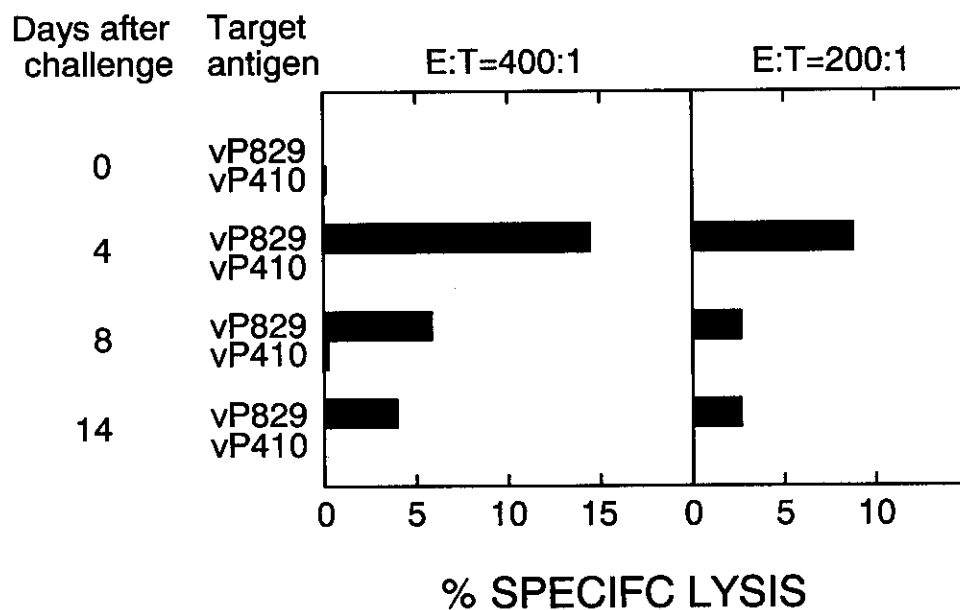


図6. pcJEME免疫マウスにおける攻撃後のプライマリーCTL活性の推移。グループあたり2匹のマウスを6週令時に100ugのpcJEMEにより免疫し、9週令時に攻撃した。攻撃前（day 0）及び攻撃後4、8及び14日目に脾臓細胞を採取した。脾臓細胞は、直接（*in vitro* stimulationなしに）CTL試験に供した。CTL試験は、vP829あるいはvP410感染P815細胞を標的として標準法により行った（「材料と方法」参照）。

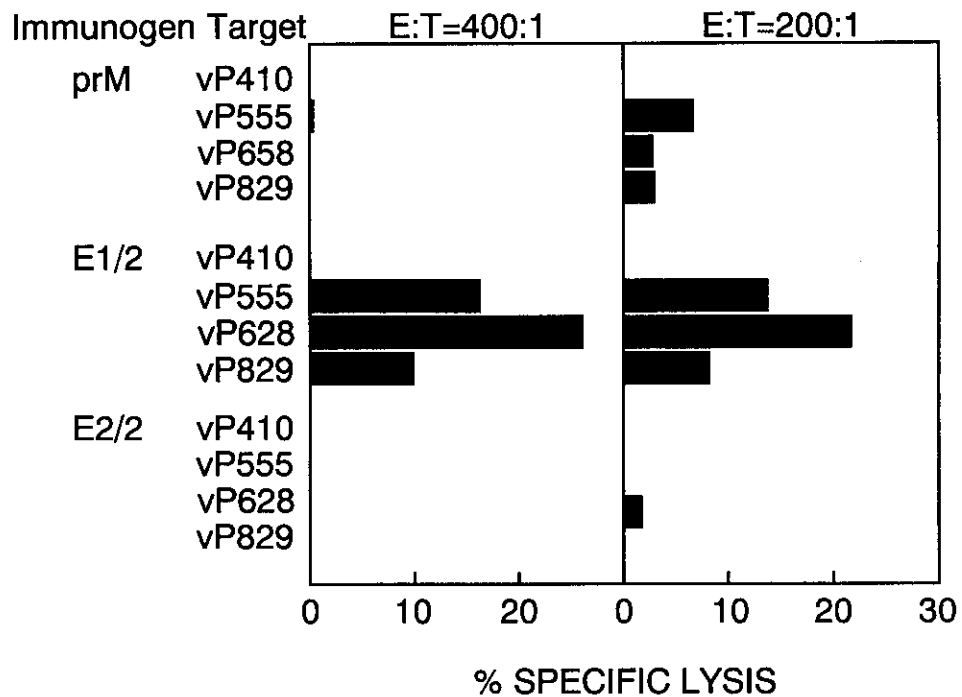


図7. prM遺伝子 (prM) またはE遺伝子の前半部 (E1/2)、後半部 (E2/2) を含むプラスミドにより免疫したBALB/cマウスにおける記憶CTLの誘導。グループあたり2匹のマウスを6及び8週令時に100ugのそれぞれのプラスミドにより免疫し、10週令時に脾臓を採取して記憶CTLを調べた。CTL試験は、vP555、vP658、vP829あるいはvP410感染P815細胞を標的として標準法により行った（「材料と方法」参照）。

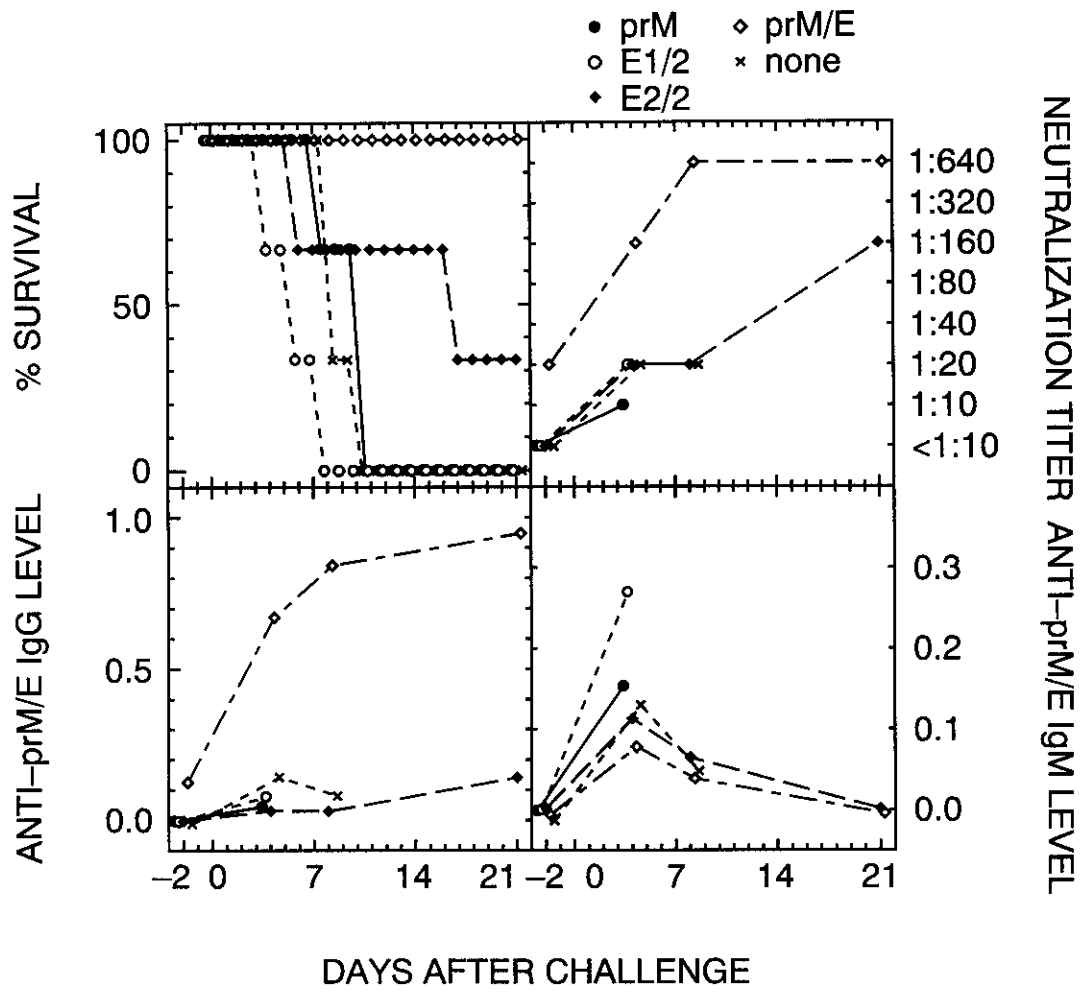


図8. prM遺伝子 (prM) またはE遺伝子の前半部 (E1/2)、後半部 (E2/2) を含むプラスミドにより免疫したBALB/cマウスにおける攻撃後の生存曲線及び抗体価の推移。グループあたり3匹のマウスを、6及び8週令時に100ugの上記プラスミド及び対照としてpcJEME (prM/E)、pcDNA3 (none) により免疫し、12週令時に攻撃した。攻撃2日前、攻撃後4、8及び21日目に採取した血清を中和試験及びELISA試験に供した。なお、pcJEME免疫群において麻酔時に1匹が死亡し、残りの2匹から得られたデータを記載した。

分担研究報告書

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

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）
高崎智彦（国立感染症研究所ウイルス1部）
中山幹男（国立感染症研究所ウイルス1部）
倉根一郎（国立感染症研究所ウイルス1部）
Peter W. Mason（米国プラムアイランド動物病センター）

研究要旨 pcDNA3をベクターとして日本脳炎ウイルス（JEV）の前駆膜（prM）シグナル、prM及び外被膜（E）遺伝子を組込んだプラスミド（pcJEME）の、マウスにおける免疫原性及び防御免疫誘導能をすでに報告した。しかし、ヒト用DNAワクチンを開発するためには、pcDNA3はアンピシリン耐性遺伝子を有するなど、ベクターとして適切でない点があった。本研究では、ヒト用に開発されたpNGVL4aベクターにpcJEMEと同じJEV遺伝子カセットを組み込みpNJEMEを作製した。pNJEMEをトランスフェクトしたCHO細胞はJEVのprMおよびEを発現した。100ugのpNJEMEを筋肉内に接種することにより2回免疫したICRマウスには、抗体価が1:10から1:20の中和抗体（90%プラーク減少法）が誘導され、すべてのマウスが10,000LD₅₀のJEV北京P3株による攻撃に対して生残した。対照としてpNGVL4aベクターを接種したマウスには中和抗体は誘導されず、攻撃に対して防御されなかった。また、pNJEME接種マウスにはJEV特異記憶CTLが検出された。これらの結果により、pcNJEMEがマウスにおいて中和抗体、CTL及び防御を誘導することが証明された。

A. 研究目的

新型ワクチンの1つとしてDNAワクチンは有望視されている。昨年度の本研究報告において、我々は有力な日本脳炎DNAワクチン候補を報告した。このDNAワクチンは、pcDNA3をベクターとして日本脳炎ウイルス（JEV）

の前駆膜（prM）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）である。このpcJEMEは、マウスに中和抗体及び防御免疫を誘導することが証明された。しかし、このDNAワクチンをヒトに用いるためには、pcDNA3はベクターと

して適切でない点があった。transformしたバクテリアの選別にアンピシリン耐性遺伝子を用いているが、自然界でアンピシリン耐性細菌を生じる可能性があること、またベクターに含まれるSV40由来の遺伝子に癌原性があることなどである。ヒト用プラスミドベクターに必要な条件として、現在臨床試験段階に進んでいる他のDNAワクチンには、概ね以下の4項目が取り入れられている。

- (1) transformしたバクテリアの選別にはカナマイシン耐性遺伝子を用いる。
- (2) 発現量を高めるためにヒトイントロンを付加する。
- (3) SV40 由来の遺伝子は除く。
- (4) ISS(immunostimulatory sequence) を付加する。

本研究では、この4条件を満足する候補ベクターの1つであるpNGVL4aを用いて、pcJEMEと同じJEV遺伝子カセットを組み込み、pNJEMEを作製した。サル実験の前段階として、マウスにおける免疫原性及び防御免疫誘導能を調べた。

B. 研究方法

プラスミド：pNGVL4aベクターはミシガン大学National Gene Vector Laboratoryから分与を受けた。pNGVL4aは、ヒト用DNAワクチンを作製するために開発されたベクターの1つである(図1)。すでに作製しているpcJEMEからEcoR1/Xba1を用いてシグナル/prM/E遺伝子カセットを含むDNAを取り出し、pNGVL4aのEcoR1/Xba1サイトに挿入して、新しいプラスミド(pNJEME)を作製した。組み込みに用いたEcoR1/Xba1サイト付近の塩基配列をシーケンシングにより調べ、正しく組み込まれていること

を確認した。また、発現実験及びマウス実験に供したプラスミド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。

発現実験：Transfectam (Biosepra)を用いてCHO細胞をpNJEMEあるいはpNGVL4aベクターによりトランスフェクトした。24時間後に細胞を固定し、prM(J2-2F1)あるいはE(J3-11B9)に対するモノクローナル抗体で免疫染色した。

マウス実験：6週令の雄Balb/cをグループあたり8匹用いた。免疫原として100ugのプラスミドDNA(pNJEME、pNGVL4a、pcJEME)あるいは1/10ドーズのヒト用日本脳炎不活化ワクチン(阪大微研)を用いた。接種ルートは、筋肉内(DNA)あるいは腹腔内(不活化ワクチン)であった。これらの免疫原を2週間隔で2回接種した(6週令及び8週令時)。2回目の免疫から2週間後(10週令時)に2匹から脾臓細胞を採取し、また3週間後(11週令時)に6匹から眼窩静脈叢より採血し血清を分離した。また、採血した6匹のマウスは50,000LD₅₀のJEV北京P3株の腹腔内接種により攻撃し、21日間生死を観察した。血清はグループごとにプールした後、中和試験に供した。また脾臓細胞はCTL試験に供した。

中和試験：90%プラーク減少法により血清中の中和抗体価を測定した。

CTL試験：脾臓細胞をJEVにより刺激した後に、⁵¹Crを用いた標準法によりCTL試験を行った(本年度の同研究班分担研究報告書『』参照)。

C. 研究結果

ウイルス蛋白の発現：pNJEME をトランスフェクトしたCHO細胞には、抗prMあるいは抗E抗体により約5%の細胞が染色された。一方pNGVL4aベクターによりトランスフェクトした細胞はいずれの抗体によっても染色されなかった。この結果はpNJEMEがCHO細胞においてprM及びE抗原を発現したことを示す。

なお、pcJEMEをトランスフェクトした細胞も抗prMあるいは抗E抗体により染色され、その染色強度はpNJEME をトランスフェクトした細胞と同程度であった。この結果はpNJEMEによるprM及びE抗原の発現量は、pcJEMEによる発現量とあまり差がないことを示す。

中和抗体及び防御免疫の誘導：100ugのpNJEMEを2週間隔で2回BALB/cマウスに筋肉内接種し、中和抗体及び防御免疫の誘導を調べた(表1)。その結果、1:10の中和抗体が誘導され、攻撃後6匹中5匹が生残した。対照として、pNGVL4aベクターを接種したマウスには中和抗体は誘導されず攻撃後にすべて死亡したのに対し、pcJEMEあるいは日本脳炎不活化ワクチンで免疫したマウスは1:10の中和抗体価が誘導され、致死量の攻撃に対して6匹中5匹が生残した。これらの結果は、pNJEMEの2回免疫によりマウスに中和抗体及び防御免疫が誘導されたことを示す。

記憶CTLの誘導：100ugのpNJEMEを2週間隔で2回接種したBALB/cマウスに、記憶CTLの誘導が認められた。

D. 考察

pNJEMEのマウスにおける防御免疫誘導能が証明された。研究目的の項に述べたようにヒト用DNAワクチンの開発には効力・安全性の観点から4

つの条件が現在のところ必要とされている。この条件を満足する市販のベクターは今のところ見当たらない。他の病原体に対するDNAワクチンの臨床試験には、それぞれの研究室で独自にベクターを作製しているようである。pNGVL4aはこれらの条件を満たすと共に、マルチクローニングサイトにpcDNA3ベクターと共通の制限酵素サイト(EcoR1/Xba1サイト)を有し、新しいプラスミドの構築が容易であることも、このベクターを選択した理由の1つである。

pcJEMEと同一の遺伝子カセットをもつpNJEMEは、発現量を数倍高めるとされるヒトイントロンを搭載しており、発現実験において、また免疫実験においてpcJEMEより高い発現及び中和抗体の誘導が期待された。しかし、今回の実験ではヒトイントロンの効果は認められなかった。この結果は、pcJEME自体の発現量が本来高いことに起因すると考えられる。

pcJEMEにより中和抗体が誘導されたが、その抗体価は検出閾値である1:10であった。誘導される中和抗体価が低いことはpcJEMEにおいても認められており、DNAワクチンの特徴の1つと考えられる。特に接種ルートが筋肉内である場合、Th1応答が誘導される傾向にあり、抗体よりCTLの誘導をもたらす。

これまで我々はマウスを対象動物としてDNAワクチンの免疫誘導能を調べてきたが、今後pNGVL4aをベクターとしてブタやサルをも対象にして研究を進める予定である。

E. 結論

ヒト用プラスミドベクターとして開発されたpNGVL4aに、JEVのprMシグナル、prM及びE遺伝子を組込んで

作製したプラスミドpNJEMEは、マウスに中和抗体及び防御免疫を誘導することが明らかにされた。

(本研究に用いたpNGVL4aベクターを分与していただいたミシガン大学 National Gene Vector Laboratory に謝意を表す。なお、ミシガン大学 National Gene Vector Laboratory が pNGVL4aベクターを開発するにあたり、米国健康研究所から研究補助(NIH grant#U42RR11149)を受けた。)

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. pNJEMEの2回免疫による中和抗体及び防御免疫の誘導

免疫原 ^a	投与経路	投与量	中和抗体価 ^b	生存率 ^c
pNJEME	筋肉内	100ug	1:10	5/6
pcJEME	筋肉内	100ug	1:10	5/6
pNGVL4a	筋肉内	100ug	<1:10	0/6
不活化ワクチン ^f	腹腔内	1/10ドーズ	1:10	5/6

^a各免疫原を6匹の雄BALB/cマウスに6及び8週令時に接種した後、11週令時に攻撃した。

^b90%プラーク減少を示した最高血清希釈倍数。

^c50,000 LD₅₀のJEV北京P3株による攻撃後21日目の生残マウス数/攻撃マウス数。

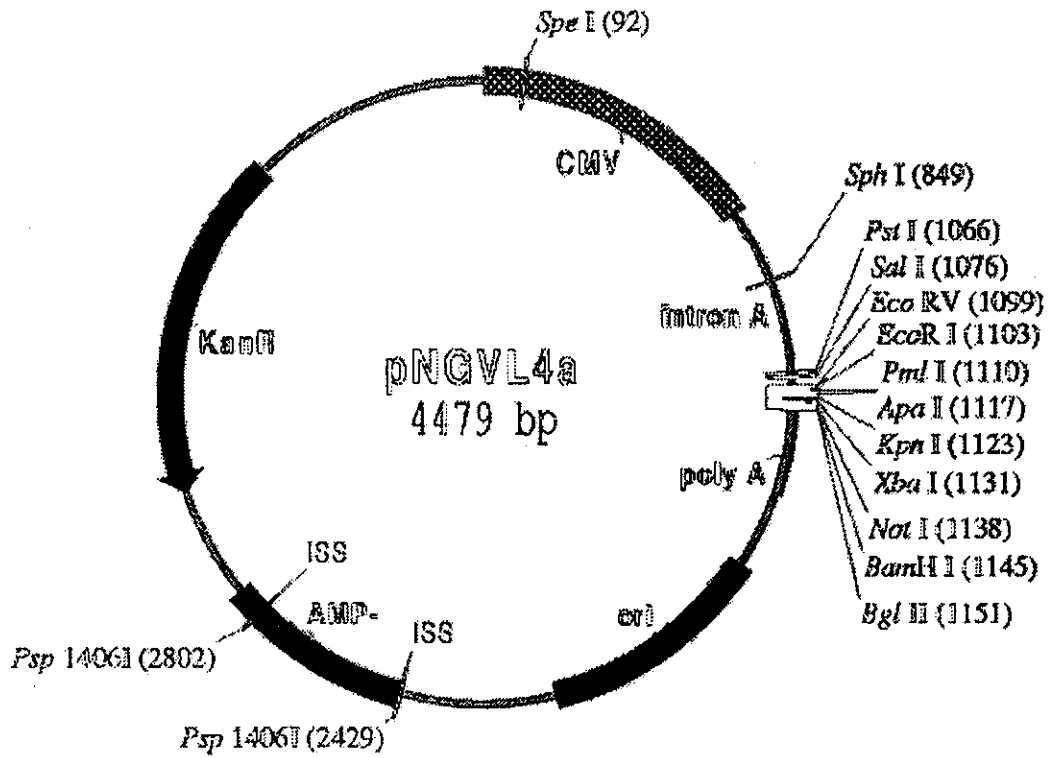


図1. pNGVL4aベクター。ミシガン大学National Gene Vector Laboratoryのホームページから転載。

pNGVL4a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

分担研究者 高崎智彦(国立感染症研究所ウイルス第1部)

共同研究者 小西英二(神戸大学医学部医療基礎学講座)

山岡政興(兵庫県衛生研究所)

倉根一郎(国立感染症研究所ウイルス第1部)

研究要旨: 昨年用いた pcDNA3 ベクターに替えて、Ampicillin 耐性遺伝子のかわりに Kanamycin 耐性遺伝子を組み込んだ pNGVL4a ベクターを用いて、日本脳炎ウイルス(JEV)前駆膜(prM)および外被膜(E)遺伝子を組み込んで作成した日本脳炎 DNA ワクチン pNJEME のマウスにおける細胞障害性 T 細胞の誘導能を測定した。JEVのprM・E、E・NS1およびprM・E・NS1を発現する組み替えワクチニアウイルスを用いた実験から、pcDNA3 ベクターを用いた pcDNA3JEME 同様に pNGVL4aJEME がマウスにおいて JEV 特異的細胞障害性 T 細胞誘導能を有することが証明された。

A. 研究目的

我々は、昨年JEVの前駆膜(prM)および外被膜(E)遺伝子を組み込んで作製した日本脳炎 DNA ワクチン pNJEME がマウスにおいて JEV 特異的細胞障害性T細胞誘導能を有することが証明した。今回、本ワクチンの実用化に向けてpcDNA3ベクターに組み込まれている Ampicillin 耐性遺伝子のかわりに Kanamycin 耐性遺伝子を組み込んだ pNGVL4a ベクターを用いて同様にして作製した日本脳炎 DNA ワクチン pNGVL4aJEME が JEV 特異的細胞障害性 T 細胞誘導能を有するかどうかを調べた。

B. 研究方法

プラスミド:pNGVL4a ベクターに JEV のprMおよびE遺伝子を挿入して pNJEMEを作製した。

ウイルス:JEV(Nakayama strain)

マウス実験:4週令の雌 Balb/c マウスを用

いた免疫原として 100/ μ gの pNJEME を、2週間隔で2回筋肉内接種し、2週間後に脾臓を摘出して用いた。

細胞障害性 T 細胞試験:p815細胞を日本脳炎ウイルスprM およびE遺伝子を組み込んだワクチニアウイルス(VP829)、およびワクチニアウイルス非感染p815細胞をターゲットとして用いた。細胞障害性 T 細胞活性は細胞を⁵¹Crで標識し、エフェクターとして6時間培養後、上清中の⁵¹Crの量を測定した。

C. 研究結果

pNJEME で免疫したマウスの脾細胞を一週間日本脳炎ウイルス抗原で刺激することにより、日本脳炎ウイルス遺伝子を組み込んだワクチニアウイルス感染 Primary kidney 細胞(p815)を溶解する細胞障害性T細胞が誘導された(Table)。しかし、最も強い細胞障害活性を示したのは VP815

(prM+E)であり、VP658(E,NS1)と VP555 (prM, E, NS1)には弱い活性を示した。また、前回もちいた pcDNA3JEME を陽性コントロールとして本実験でも使用したがやはり VP658(E,NS1)には強い活性を示さなかった。

D. 考察

フラビウイルス感染に対して防御免疫を誘導する蛋白質として prM、E、NS1 が考えられている。これはそれぞれの蛋白質に対する単クローン抗体がマウスを日本脳炎ウイルスによる challenge から防御できるという報告にもとづいている。

昨年我々は、JEV の prM および E 遺伝子を市販の pcDNA3 ベクターに挿入して作製したプラスミド pcDNA3JEME が、マウスにウイルス特異的細胞障害性 T 細胞を誘導することを明らかにした。DNA ワクチン実用化に向けて、Ampicillin 耐性遺伝子のかわりに Kanamycin 耐性遺伝子を組み込んだ pNGVL4a ベクターを用いても JEV 特異的細胞障害性 T 細胞を誘導することが今回の実験で確認された。誘導されたマウス細胞障害性 T 細胞は、VP815 (prM+E) に対して最も強い細胞障害活性を示し、VP658 (E,NS1)には弱い活性を示した。一方、pcDNA3JEME を用いた場合 VP555 に活性を示したにもかかわらず、pNJEME の場合には VP555 (prM, E, NS1)にそれほど強い活性を示さなかったことについては、その理由は不明であり、今後の検討課題である。

E. 結論

DNA ワクチン実用化に向けて、Ampicillin 耐性遺伝子のかわりに Kanamycin 耐性遺

伝子を組み込んだ pNGVL4a ベクターを用いて日本脳炎ウイルス (JEV) 前駆膜 (prM) および外被膜 (E) 遺伝子を組み込んで作製した日本脳炎 DNA ワクチン pNGVL4aJEME がマウスにおける JEV 特異的細胞障害性 T 細胞を誘導することが確認された。

F. 研究発表

1. 論文発表

Serum antibodies to human herpesvirus 7, human herpesvirus 6 and Cytomegalo-virus in patients with idiopathic facial nerve palsy or sudden deafness. Tomohiko Takasaki, Masahiko Higashikawa, Soichi Motoyama, Kunihiro Sugita, Ichiro Kurane. The Journal of Laryngology and Otology 112: 617-621 (1998)

小田原史知、佐野浩一、大竹徹、大久保進、中野隆史、高崎智彦、美崎英生、中井益代: HIV-1 感染者血清中の逆転写酵素活性阻止抗体の動態。感染症学雑誌 72:694-700 (1998)

Hirokuni Aihara, Tomohiko Takasaki, Takaji Matsutani, Ryuji Suzuki, Ichiro Kurane Establishment and characterization of Japanese Encephalitis Virus-specific, human CD4+ T cell clones: Flavivirus crossreactivity, protein and cytotoxic activity. Journal of Virology 72:8032-8036 (1998)

Takehiro Khno, Toshiyuki Goto, Tomohiko Takasaki, Chizuko Morita, Takaaki Nakaya, Kazuyoshi Ikuta, Kouichi Sano, Ichiro Kurane, Masuyo Nakai: Fine structures and morpho-genesis of Borna Disease Virus (BDV)
Journal of Virology 73: 760-766 (1999)

Takeshi Honda Tomohiko Takasaki, Kiyotaka Okuno, Masayuki Yasutomi
Ichiro Kurane: Establishment and characterization of Epstein-Barr virus-specific human CD4+ T lymphocyte clones. Acta virologica 42: 307-313, (1998)

Ken-Ichiro Yamada, Tomohiko Takasaki, Masaru Nawa, Ichiro Kurane: Laboratory diagnosis of imported dengue cases. Japanese journal of tropical medicine and hygiene. 26 (in press) (1998)

Ichiro Kurane, Tomohiko Takasaki. Dengue virus-specific T lymphocyte responses and the role of T lymphocyte in the pathogenesis of Dengue hemorrhagic fever. Japanese (in press) (1998)

journal of tropical medicine and hygiene. 26

2. 学会発表

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総会(1998)。

藤原将寿、佐藤恵美、岡本昌之、高崎智彦、紺野謙治、横田智之、倉根一郎、茂田士郎: MTT法を応用した抗 dengue virus 剤スクリーニング法の開発。第46回日本ウイルス学会総会(1998)

河野武弘、後藤俊幸、高崎智彦、森田智津子、中屋隆明、生田和良、佐野浩一、倉根一郎、中井益代: ボルナ病ウイルス(BDV)粒子の構造と形態形成過程。第46回日本ウイルス学会総会(1998)

高崎智彦、山田堅一郎、名和 優、岩崎恵美子、倉根一郎: デングウイルス感染者に対する検査法。第73回日本感染症学会総会(1999)

Table 1

	E/T Ratio	VP829(preM, E)	VP658(E,NS1)	VP555(preM,E,NS1)	Control
pNGVL4a	200	11.2	9.1	12.6	0
	100	7.1	6.0	0	0
	50	18.4	0.3	31.5	0
pN JEME	200	9.3	15.5	0	13.1
	100	<u>38.7</u>	5.6	<u>7.9</u>	0
	50	<u>42.9</u>	<u>7.2</u>	2.5	0
pcDNA3	200	13.6	1.9	23.2	2.2
	100	1.80	5.3	27.4	0.4
	50	7.30	5.6	23.5	0
JE inacti	200	0.1	3.2	0	9.4
	100	0	0	0	0
	50	0	0	0	0

1.pNJEME は、pNGVL4a を用いて作製した日本脳炎 DNA ワクチンである。

2.PcDNA3JEME 前回その JEV 特異的細胞障害性 T 細胞誘導能を確認した日本脳炎 DNA ワクチンである。

3.コントロールは、ワクチニアウイルス非感染の細胞(p815)をターゲットとして用いた場合の細胞障害度である。

4.数字は、(JEV 感染Vero細胞抗原により刺激した細胞がターゲット細胞殺した割合:%)より(非感染Vero 細胞抗原により刺激した細胞がターゲット細胞殺した割合:%)を減じたものである。

分担研究報告書

ブタにおける日本脳炎DNAワクチンの免疫誘導能

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）
高崎智彦（国立感染症研究所ウイルス1部）
中山幹男（国立感染症研究所ウイルス1部）
倉根一郎（国立感染症研究所ウイルス1部）
Peter W. Mason（米国プラムアイランド動物病センター）

研究要旨 ブタは自然界における日本脳炎の増幅動物である。日本脳炎ウイルス（JEV）の前駆膜（prM）シグナル、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）の、ブタにおける中和抗体及び赤血球凝集抑制（HAI）抗体誘導能を調べた。pNGVL4aは、自然界で使用された場合の安全面を考慮して設計されたベクターである。8-12週令の去勢雄または雌のミニブタ（ヨークシャー種）を用いて、100ugまたは450ugのDNAを筋肉内または皮内に3週間隔で2回接種した後、1週目に1:40から1:80の中和抗体価、また1:40から1:160のHAI抗体価が誘導された。筋肉内接種は皮内接種より、また筋肉内接種において450ugのDNAは100ugより高いレベルの中和抗体を誘導した。pNJEMEはpcJEMEと同等の抗体誘導能を示した。pNJEME免疫ブタにおいて、不活化ワクチンによる攻撃後、HAI抗体価の急激な上昇が認められ、記憶B細胞の存在が明らかにされた。また、pNJEME免疫ブタはHAI抗体を少なくとも124日間保持した。以上の結果により、JEVのprMシグナル、prM及びE遺伝子を組込んだプラスミドDNA、特にpNJEMEはブタにおいて有力な日本脳炎ワクチン候補となることが示された。

A. 研究目的

自然界において日本脳炎ウイルス（JEV）は、ブタを増幅動物とし、蚊により媒介されてヒトに感染する。したがって、ブタへのワクチン投与は感染経路対策として公衆衛生上大きな

意義を持つ。また、ブタ自身も感染により流産などを引き起こすため、ワクチン投与は家畜経済上重要な役割を担う。現行のブタ用日本脳炎ワクチンは、弱毒ワクチン及び不活化ワクチンであるが、安全性・経費の面などにお

いて問題点が指摘されてきた。これらの短所を克服するために新型ワクチンの登場が期待されている。新型ワクチンに対する種々のアプローチの中で、遺伝子操作を利用して免疫の誘導に重要な遺伝子だけを宿主内で発現させる方法が注目されている。特に、宿主に免疫応答を起こすとは考えにくいプラスミドベクターを用いて、目的の遺伝子を宿主に導入するDNAワクチンが有望視されている。

我々は、pcDNA3をベクターとして日本脳炎ウイルス中山株のprM及びE遺伝子を組込んだプラスミド(pcJEME)を作製し、このプラスミドがマウスに中和抗体を誘導し、致死量のウイルスによる攻撃から防御することを証明した(昨年度の同研究班分担研究報告書『日本脳炎DNAワクチンの開発：マウスにおける防御免疫誘導』)。pcJEMEは、有力な日本脳炎DNAワクチンの候補と考えられ、本研究ではブタにおけるpcJEMEの免疫原性を調べることを目的の1つとした。しかし、DNAワクチンの実用化のためには自然界に放出された場合の安全性を考慮する必要がある。pcDNA3ベクターにはアンピシリン耐性遺伝子やSV40由来の遺伝子が含まれる。アンピシリン耐性遺伝子は、アンピシリン耐性菌を生み出す危険性があり、またSV40由来の遺伝子は癌原性が懸念されている。そこでこれらの点を解消すべく、ヒト用日本脳炎DNAワクチンの候補として作製したpNJEME(本年度の同研究班分担研究報告書『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』参照)のブタにおける免疫原性を調べることも、本研究の目的とした。

B. 研究方法

プラスミド：pcDNA3及びpNGVL4aをベクターとして、JEVの前駆膜(prM)シグナル、prM及び外被膜(E)遺伝子からなるカセットを組み込み、それぞれpcJEME及びpNJEMEを作製した。pcJEMEの作製法は昨年度の同研究班分担研究報告書『日本脳炎DNAワクチンの開発：マウスにおける防御免疫誘導』に、またpNJEMEの作製法は本年度の同研究班分担研究報告書『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』に詳述した。ブタに投与するこれらのプラスミドDNAは、キアゲンDNA精製キットにより精製した。

ウイルス：JEV中山株を中和試験に用いた。

不活化ワクチン：動物用日本脳炎不活化ワクチン(日本脳炎不活化予防液：化学及血清療法研究所)を用いた。

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。なお、金粒子からDNAを溶出させ定量した結果、1ショットあたりの金粒子に吸着していたDNAは430ngであった。6ショット分は2.6ugに相当する。

筋肉内投与と皮内投与を比較した実験、pNJEMEによる中和抗体・HAI抗体の誘導及び免疫持続期間を調べ

た実験、及び攻撃実験では、5頭を1グループとして、1頭あたり100ugまたは450ugのDNAを筋肉内または皮内に3週間隔で2回接種した。対照として、1mlの不活化ワクチンを皮下に2週間隔で2回接種した。これらのブタから毎週採血することにより、中和抗体価及び赤血球凝集抑制(HAI)抗体価の推移を調べた。また、接種に起因する病変も観察した。

攻撃実験：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。

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。

HAI試験：市販の日本脳炎ウイルス抗原液（デンカ生研）を用いて、定法に基づき血清中のHAI抗体価を測定した。

C. 研究結果

pcJEMEによるHAI抗体の誘導：400ugのpcJEMEあるいはpcDNA3をそれぞれ1頭のブタに2回筋肉内接種してHAI抗体の推移を調べた(図1)。pcJEME免疫ブタにおいて1回目の接種後2週目に1:16のHAI抗体価が認められ、5週目まで持続した。2回目の接種後1週目にHAI抗体価は1:256に上昇し、その後徐々に低下したが、5週目にはなお1:64の抗体価が認められた。一方、pcDNA3免疫ブタにおいてHAI抗体は10週の実験期間内には認められなかった。この結果は、ブタにおけるpcJEMEのHAI抗体誘導能を示す。

ジーンガンによる投与と筋肉内投与の比較：2頭のブタを用いて、pcJEMEをジーンガンにより接種し、誘導されるHAI抗体価を、筋肉内投与によって誘導されるHAI抗体価と比較した(図1)。1回目の接種後HAI抗体が検出されたのは3週目であり、その抗体価は1:8であった。2回目の接種後1週目に、1頭は1:128を他の1頭は1:64にまで上昇したが、3週目には共に1:8まで低下した。この結果は、2.6ugのpcJEMEをジーンガンにより投与したブタにはHAI抗体が誘導されるが、100ugのpcJEMEを筋肉内に投与したブタに誘導されるHAI抗体価よりやや低いレベルであることを示す。

筋肉内投与におけるドーズの比較：1グループ5頭のブタに100ugあるいは450ugのpcJEMEを筋肉内接種して、中和抗体価及びHAI抗体価の推移を比較した。初回免疫後8週目までに採取されたプール血清を用いた結果を図2に、また初回接種後4週目と7週目の検体について、個々のブタを対象にして抗体価を調べた結果を図3に示す。450ugを接種したグループにおいては、初回接種後2週目に1:10の、また追加接種後1週目に1:80の中和抗体価が認められた。一方、100ug接種グループにおいては、初回接種後には検知される中和抗体は認められず、また追加接種後1週目の中和抗体価は1:40であった。筋肉内接種において450ugのDNAが100ugのDNAより高いレベルの中和抗体を誘導する傾向は、HAI抗体価の推移(図2)、また初回接種後4週目と7週目における個々のブタの抗体価(図3)においても認められた。

筋肉内投与と皮内投与の比較：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(図2、図3)。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。

pNJEMEによる中和抗体の誘導：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(図2、図3)。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抗体共いづれの接種群においても最大で4倍または8倍であった。

攻撃実験：pNJEMEを3週間隔で2回接種後14週目のブタは、1:10あるいは1:20のHAI抗体価を、また不活化ワクチンを2週間隔で2回接種した後15週目のブタは<1:10あるいは1:10のHAI抗体価を示した。不活化ワクチンによる攻撃後、pNJEME免疫ブタにおいては、2日目に1:20から1:40を示し、4日目に1:40から1:80、そして8日目には1:2560のHAI抗体価にまで上昇した。一方、不活化ワクチン免疫ブタにおいては、2日目には上昇が認められず、4日目に1:10、そして8日目の

HAI抗体価は1:10から1:80にとどまった。対照として2頭に生理食塩水を接種したが、pNJEME免疫ブタ、不活化ワクチン免疫ブタ共に8日目まで有意の変化は認められなかった。これらの結果は、pNJEME免疫ブタにおいて、攻撃後に高いレベルの中和抗体を供給するに足る記憶B細胞が、追加免疫後少なくとも14週間は保持されたことを示す。

免疫持続期間：pNJEMEを3週間隔で2回接種したブタ2頭及び不活化ワクチンを2週間隔で2回接種したブタ2頭から、初回接種後124日目まで定期的に採血し、HAI抗体価を測定した。その結果、pNJEME免疫ブタは124日目においても1:10から1:20のHAI抗体価を保有していた。また、不活化ワクチン免疫ブタは63日目までは多くの場合<1:10を示したが、84日目から124日目までは1:10のHAI抗体価を示した。以上の結果は、pNJEME免疫によりブタに誘導されたHAI抗体価は少なくとも124日間は保持されることを示す。

安全性：pcJEME及びpNJEME共に筋肉内接種後の局所及び全身における病変は、この実験期間中は観察されなかった。ジーンガンによるDNA投与においては、接種直後から局所の炎症が認められた。本実験においては、ブタ1頭あたり6ショット投与したので、直径約2cmの円形の炎症が6箇所腹部の皮膚上に生じた。

D. 考察

pNJEMEは、アンピシリン耐性遺伝子の代わりにカナマイシン耐性遺伝子を用い、またSV40由来の遺伝子を排除するという工夫により、安全性に関してpcJEMEの欠点を補ったDNAワクチンである。本研究により、