

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

新しい日本脳炎ワクチンの開発に関する緊急研究

(H10-新興-64)

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. 新しい日本脳炎ワクチンの開発に関する緊急研究・・・・・・・・・・ 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. 組織培養不活化日本脳炎ワクチンの開発に関する研究・・・・・・・・ 9  
分担研究者：中山幹男（国立感染症研究所 ウイルス第一部）
  
3. 新しい日本脳炎ワクチンの開発：日本脳炎ウイルスとデングウイルスの  
キメラを用いた病原性の解析・・・・・・・・・・・・・・・・ 23  
分担研究者：只野昌之（琉球大学医学部 ウイルス学講座）
  
4. デングウイルス持続感染ヒト B 細胞株感染機構の超微形態学的解析・ 38  
分担研究者：高崎智彦（国立感染症研究所 ウイルス第一部）

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

新しい日本脳炎ワクチンの開発に関する緊急研究

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：本研究は世界的に新興・再興感染症として大きな問題となっている日本脳炎の防御対策を主題としたものである。日本脳炎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。現行の日本脳炎ワクチンはマウス脳由来のものであり、有効性は確認されているが、問題点の指摘も多い。本研究においては日本脳炎ウイルスに対する新たなワクチンの開発を最終的な目標とした。現行のマウス脳由来日本脳炎ワクチンに代わるワクチンとしての組織培養由来日本脳炎ワクチンの開発は実用化の面から新たなワクチンとして重要で現実的なオプションの一つであり、培養法、分離精製法の開発を研究を行った。また本研究においては、日本脳炎ウイルスと脳炎を起こさないデングウイルスとの間で作製されたキメラウイルスの性状を解析し、日本脳炎ウイルスの脳神経毒性あるいは脳神経侵襲性等の病原性に関わるウイルス側の要因を明らかにした。

A. 研究目的

日本脳炎は致死率約25%、全患者の約半数は回復するものの精神神経に後遺症を残す重篤な感染症である。患者は東アジア、東南アジア、南アジアにおいて発生するが、オーストラリアにおける日本脳炎の発生も報告されている。世界的には年間約7万人の患者数と推察されているが、症状の重篤度、高い致死率から非常に重要な再感染症の一つである。

本研究は日本脳炎の防御対策を主題としたものである。日本脳炎ウイルス

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。現行の日本脳炎ワクチンはマウス脳由来のものであり、有効性は確認されているが、問題点の指摘も多い。現行のマウス脳由来日本脳炎ワクチンに代わるワクチンとしての組織培養由来日本脳炎ワクチンの開発は実用化の面から新たなワクチンとして重要で現実的なオプションの一つであり、本研究では、実用化の点から最も具体性のある(1)組織培養由来不活化ワクチン開発へ向けての基礎的研究、(2)試作ワクチンの防御

免疫誘導能の検討、(3) 経口およびキメラ日本脳炎ワクチン開発の可能性の検討、を目的とする。

## B. 研究方法

1) ウイルス：日本脳炎ウイルス北京株及び中山株を用いた。

2) 細胞：

Vero 細胞は、ヒューマンサイエンス研究資源バンク由来の JCRB9013、JCRB0111、JCRB9007、感染研由来 (NIID)、ATCC 由来 JWCB002 を用いた。ワクチン製造に適した Vero 細胞の選択方法は、上記 Vero 細胞を用いてウイルス感受性、増殖性を比較し決定した。

3) 細胞におけるウイルスの最適増殖条件：細胞に対する感染量を変えて培養した後の、培養上清を経時的にサンプリングし、ウイルス感染価、ガチョウ赤血球凝集価 (HA 価)、ELISA 法を用いての抗原価の測定を行い、これらの成績から推定した。

4) ウイルスの遺伝的解析：北京株を用い Vero 細胞で 5 代継代したウイルスと、マウス脳継代ウイルスの E 蛋白領域のウイルスゲノムの配列、そのアミノ酸配列を比較することにより検討した。

5) ウイルス精製法：ハイドロキシアパタイトセラミックス (HAC) を用いた。大きさは  $40\mu$  の粒子結晶で、粒子の大きさが揃っている近年開発されたものである。

6) キメラウイルスの作製：pM147 を鋳型として PCR 法で日本脳炎ウイルス外被膜蛋白 (prM および E 蛋白) 領域 cDNA を調製した。この PCR 産物を p2AXho の

相同領域と置換し、5' NCR に 6 塩基の欠失 (T76-A81) を含むもの (p2AJE[5' d+, ME]) と、それを含まないもの (p2AJE[5' d-, ME]) を作製した。それぞれのクローンから転写された RNA を Dengue および日本脳炎ウイルスに感受性のあるヒトスジシマカ由来細胞 (C6/36) にカチオンリポソーム存在下で導入した。

7) マウス接種実験：1 日齢の ICR マウスをキメラウイルスの病原性解析に用いた。C6/36 細胞で増殖した各キメラウイルスを 2% FBS を含むイーグル MEM で 5 ないし 10 倍階段希釈し、マウスの脳内 (ic,  $25\mu$  l/mouse) あるいは腹腔内 (ip,  $100\mu$  l/mouse) に 1 希釈当たり 1 腹 (10-12 mice) ずつ接種した。接種後、死亡の有無を 28 日間観察し、Reed-Muench 法で 50% 致死量 (LD50) を計算した。

## C. 研究結果

### 1) 日本脳炎ウイルスの増殖性

ワクチン製造に適した Vero 細胞を決める為に、北京株、中山株を用いて、ウイルスを接種される細胞数に対する接種ウイルス量の比 (感染多重度: MOI) を 0.1 に設定して、各 Vero 細胞に感染させた。北京株では、JCRB9013、ATCC 由来 JWCB002 細胞でのウイルス増殖が優れていたが、中山株では ATCC 由来 JWCB002 が優れていた。

### 2) ウイルス最適増殖条件

細胞に接種するウイルス量を MOI 100 から 0.01 まで変えて細胞に接種し、感染後 7 日までの培養上清についてウイルス量 (PFU)、HA 価、抗原価を

測定した。至適ウイルス接種量は、M O I 100 から 0.1 の範囲で差が認められず、感染後 4? 5 日に培養上清を回収すれば良いことがわかった。

### 3) ウイルスの遺伝学的解析

Vero 細胞で 5 代継代を繰り返した北京株とマウス脳で継代した北京株について、ウイルスの E 蛋白領域の塩基配列とアミノ酸配列を比較した。二つのウイルスの塩基配列及びアミノ酸配列の一致率は 99% であり、大きな変化は認められなかった。

### 4) 新しいウイルス精製法の開発

新しく開発されたハイドロキシアパタイトセラミックス (HAC) を用いて日本脳炎ウイルス感染マウス脳 10% 乳剤をモデルに精製を試みた。焼結温度 400°C の (HA1) カラムは、分画 No. 6 で見ると、焼結温度 1000°C (HA3) のカラムと比較したとき、蛋白量が高いことから蛋白吸着性に優れていることが判った。しかし、分画 No. 8,9 のウイルス画分のウイルス吸着性には相違が認められないことから、HA3 のカラムが有望と思われた。

### 5) キメラウイルスの回収と同定

5' 非翻訳領域 (5' NCR) に 6 塩基の欠失を持つ p2AJE [5' d+, ME] およびインタクトな p2AJE [5' d-, ME] から転写された RNA を導入した C6/36 細胞の培養液中に感染性子孫ウイルスを検出した。単クローン抗体を用いた免疫染色で、両子孫ウイルスに感染した C6/36 細胞には日本脳炎ウイルス由来の prM および E 蛋白とデングウイルス由来のコア蛋白が産生されているが、デングウイルス由来の E 蛋白および日本脳炎ウイルス由来の非構造蛋白は産生されてい

ないことが確認された。また、中和単クローン抗体を用いた中和試験で両ウイルスが日本脳炎ウイルスの中和エピトープを保有することも確認できた。転写 RNA の細胞内導入からウイルス産生までの期間は p2AJE [5' d+, ME] が 5 週間だったのに対して、p2AJE [5' d-, ME] では 1 週間であった。しかし、v2AJE [5' d+, ME] の増殖特性を C6/36 細胞で検討すると、親ウイルスに比べて幾分遅れはみられるものの、正常な増殖曲線が得られた。

### 6) 培養細胞における増殖特性と熱安定性

哺乳動物細胞 (Vero) および昆虫細胞 (C6/36) におけるキメラウイルスの増殖を検討した。昆虫細胞ではキメラウイルスは両方の親ウイルスより低い増殖能を示した。また Vero 細胞では 37°C の条件ではキメラウイルスは殆ど増殖しなかった。ところが、32°C の条件では Vero 細胞でも増殖した。キメラウイルスは親ウイルスに比べて熱安定性が低く、そのことが増殖に影響していると考えられた。

Vero 細胞を用いて 37°C の条件で 2 週間毎に 10 回継代したキメラについて、温度安定性、培養細胞における増殖特性、免疫染色で観察されるフォーカスの形状を測定した。Vero 細胞で継代したキメラの 37°C における熱安定性は親ウイルスと同じで、もとのキメラに比べて、フォーカスの形状も大きかった。また、Vero 細胞における増殖特性は 28°C、32°C、および 37°C の何れの条件でも差はみられなかった。

### 7) マウスに対する病原性および免疫原性の検討

C6/36 細胞で増殖したキメラウイルス v2AJE[d+, ME] および v2AJE[d-, ME] の哺乳 ICR マウス (1 日齢) に対する脳神経毒性および脳神経侵襲性を脳内 (ic) 接種と腹腔内 (ip) 接種で検討した。ic 接種実験では表 2 に見られるように、v2AJE[d+, ME] はデングウイルスに近い病原性がみられたが、v2AJE[d-, ME] は日本脳炎ウイルスに近い病原性が認められた。ip 接種では何れのキメラウイルスも最高濃度のウイルスを接種してもマウスを死に至らしめることは出来なかった。

#### 8) キメラウイルスの再構築 :

v2AJE[d+, ME] 遺伝子の 5' NCR および prM-E 領域に認められた変異を幾つかの組み合わせで含むようなキメラウイルスを再構築し、それらから転写された RNA を C6/36 細胞に導入して、一週間後の子孫ウイルス産生を確認した。

#### D. 考察

Vero 細胞には、種々の系統がありそれぞれの細胞を用いウイルスの増殖生、感受性を調べたところ、5 種類の Vero 細胞の中で ATCC 由来 Vero 細胞が優れていた。ウイルスの増殖性からワクチン製造に適していると思われた。マイクロキャリアを用いた細胞の大量培養による不活化日本脳炎ワクチン生産は、すでに日本では数社が試みており、実用化も間近と思われる。我々のこれら成績は、ワクチン開発メーカーの成績を裏付けるものであった。

ハイドロキシアパタイトセラミックスを用いたウイルスの精製法は、簡易で、一段階での精製法としては、回収率の高いことから今までに無い画期的な

精製法である。ワクチンのみならず、精製抗原を用いる体外診断薬の分野にも、応用が可能であり、ワクチンでは日本脳炎以外のウイルスワクチンに用いることで精製度の高いワクチンの改良に役立つと思われる。我々の開発したハイドロキシアパタイトセラミックスカラムを組織培養ワクチンの精製法の一部に組み込むことにより、さらに安全な組織培養不活化日本脳炎ワクチンを開発できると考える。今回は、ウイルス感染マウス脳 10% 乳剤を試したが、次回は組織培養ウイルス液の精製に応用する予定である。

本研究で作製されたキメラウイルスは 5' NCR の欠失 (T76-A81) の有無に関わらず、28°C (C6/36) と 32°C (Vero) の条件では増殖できたのに対して、37°C (Vero) では増殖が制限されていたことから、キメラが温度感受性になっていることが示唆された。キメラウイルスの遺伝子に何らかの変異が加わったことが考えられるが、5' NCR に 6 塩基欠失を持たないキメラには遺伝子上に変異が認められないにも関わらず、温度感受性の形質を有していた。このことから、遺伝子の組換え操作の過程で生じたと推定される E 蛋白領域の変異 (Leu472->Arg) が温度感受性に関与している可能性が考えられた。現在、472 番目のアミノ酸を本来のロイシンに戻し、この変異の影響を検討しているところである。いずれにしても、v2A[5' d-, ME] のマウス接種実験結果から、この変異はマウス脳神経毒性に影響していないことは明らかである。この温度感受性に関しては 37°C の培養条件でも感染 Vero 細胞中にウイルス特異

抗原が発現していることや、ウイルス液の感染価が 37°C のインキュベーションで激減したことから、感染細胞におけるウイルス遺伝子の複製や蛋白合成より、むしろウイルス粒子の形態形成や放出の過程で温度の影響を受けていると推測された。温度の影響が細胞への吸着に影響している事も考えられるので、細胞へのウイルス粒子の吸着の測定などの詳しい検討が必要と思われる。

#### E. 結論

1) 組織培養不活化日本脳炎ワクチンの製造に用いる培養細胞は、ATCC由来のVero細胞が適していた。このATCC由来Vero細胞に感染させる北京ウイルスの最適MOIは、100から0.1まで成績に大きな差を認めなかった。培養上清のウイルス回収時期は、感染後4、5日が適当であった。

2) ハイドロキシアパタイトセラミックスを用いたカラムによる、日本脳炎ウイルス感染マウス10%乳剤の精製を試みたところ、一段精製だけで高度に精製されたウイルスを得ることが出来た。

3) デングウイルス遺伝子を背景に日本脳炎ウイルス遺伝子の外被膜蛋白領域を有する二つのキメラを作製した。これらのキメラのマウス病原性の検討から、5'非翻訳領域の6塩基欠失(dT76-A81)がウイルスの弱毒化に働いていた。また、日本脳炎ウイルスの末梢部から脳への脳神経侵襲性には外被膜蛋白に加えて、他の領域の関与が必要であった。

#### 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., Kanasa-Thasan 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

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.

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 : デング熱の一例ー日大板橋病院初の報告ー. *日大医誌*: 58 (2) : 109-115, 1999.

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.

Lai C. J., Bray M., Men R., Cahour A., Chen W., Kawano H., Tadano M., Hiramatsu K., Tokimatsu I., Pletnev A., Arakaki S., Shameem G. and Rinaudo M. : Evaluation of Molecular Strategies to Develop a Live Dengue Vaccine.

2. 学会発表



Makino Y., Tadano M., Matsuo S., Hasebe F., Fukunaga. and Lai C.J.: Characterization of a Chimera Constructed Between Japanese Encephalitis Virus and Dengue Type 4 virus. IVth International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses. (1997)

牧野芳大、只野昌之、松尾幸子、馬紹平、長谷部太、五十嵐章、福永利彦: DEN4/JEV キメラウイルスの作成とその性状。第45回日本ウイルス学会総会(1997)

Tadano M., Makino Y., Ma S-P., Yamashiro T., Hasebe F., Lai C.J., Igarashi A. and Fukunaga T.: Construction and Characterization of Chimeric Japanese Encephalitis / Dengue Type 4 Virus. The Thirty-second Joint Working Conference on Viral Diseases. US-Japan Cooperatives Medical Science Program. (1998).

只野昌之、馬紹平、山城哲、加根村和美、牧野芳大、長谷部太、五十嵐章、福永利彦: 日本脳炎ウイルス/デング4型ウイルスキメラの性状に関する検討。第46回日本ウイルス学会総会(1998)

馬紹平、只野昌之、山城哲、牧野芳大、長谷部太、五十嵐章、福永利彦: JEV/DEN4 キメラウイルスの塩基配列の検討。第46回日本ウイルス学会総会(1998)

只野昌之: デングウイルス4型と日本脳炎ウイルスのキメラ作成、および生物学的性状。シンポジウム「デング熱/デング出血熱を巡って」第39回日本熱帯医学会総会(1998)

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.

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、ペスチウウイルス研究会. 1998.

## 分担研究報告書

### 組織培養不活化日本脳炎ワクチンの開発に関する研究

分担研究者 中山幹男（国立感染症研究所）  
協力研究者 松野重夫（国立感染症研究所）  
山本 晃（旭光学工業）

#### 研究要旨

日本脳炎ワクチンの製造に、マウス脳を用いず、Vero 継代細胞で増殖させたウイルスを用いる新しい不活化日本脳炎ワクチンを開発する為の基礎研究を行った。

ATCC 由来 Vero 細胞を用いることにより、ウイルス増殖性からワクチン開発が可能と思われた。Vero 細胞で増殖させたウイルスの遺伝学的変化は、大きくなかったが、抗原性については今後も検討する必要がある。ハイドロキシアパタイトセラミックスカラムを用いることにより、ワクチンの精製度を高めることができると思われた。

#### A. 研究目的

近年の日本脳炎の大規模な流行は、日本ではなく東南アジアである。日本における日本脳炎患者の発生は、年に10人以下で、1965年以前と比較すると激減している。毎年行っているブタの感染源調査によれば、日本列島の日本脳炎ウイルスの侵淫状況は、年間3000人を越える大規模な日本脳炎患者が発生した1965年以前と変わっていない。患者発生強力な抑制因子は、ヒトに対してのワクチン接種による免疫付与がその大きな役割を担

っていると考えられている。我々は、日本脳炎ワクチン接種の必要性を、感染源調査で改めて認識すると共に、将来にわたって日本脳炎ワクチンの予防接種を継続することが患者の発生を未然に防ぐために重要であると考えている。現在の不活化日本脳炎ワクチンの生産状況は、日本の7社と韓国、台湾、ベトナム、中国等であるが、年間生産数量は、2000万人分に満たないのが現状である。日本脳炎の流行は、タイ、インド、カンボジア、ベトナム、オーストラリア、マレーシア、ネパール、中国等、農業形態の変化にあわせ

て大量発生した蚊により、流行地が東南アジア全域、オセアニア地域にまで拡大し、患者数が急増している。これらの国の国民に対するワクチン接種が急務となり、ワクチンの大量生産の必要性が高まっている。現行のワクチンは、マウス脳を用いた不活化ワクチンであるが、これら需要を満たすワクチンの大量生産をするためには、大量のマウスが必要なこと、ワクチンに混入するマウス脳物質の排除の為に高度の精製が必要である事、生産コストが高い等問題点も多く抱えている。そこで我々は、安全で安価な日本脳炎ワクチンの大量生産をめざして、マウス脳を用いず、Vero 継代細胞で増殖させたウイルスを用いる、新しい組織培養不活化日本脳炎ワクチンを開発し実用化するための基礎的研究を行った。

## B. 研究方法

- 1) ウイルスは、日本脳炎ウイルス北京株及び中山株を用いた。
- 2) Vero 細胞は、ヒューマンサイエンス研究資源バンク由来の JCRB 9013、JCRB 0111、JCRB 9007、感染研由来 (NIID)、ATCC 由来 JWCB 002 を用いた。
- 3) ワクチン製造に適した Vero 細胞の選択方法は、上記 Vero 細胞を用いてウイルス感受性、増殖性を比較し決定した。
- 4) 細胞におけるウイルスの最適増殖条件は、細胞に対する感染量を変えて培養した後の、培養上清を経時的にサ

ンプルングし、ウイルス感染価、ガチョウ赤血球凝集価 (HA 価)、ELISA 法を用いての抗原価の測定を行い、これらの成績から推定した。

5) Vero 細胞で増殖させたウイルスの遺伝的解析は、北京株を用い Vero 細胞で 5 代継代したウイルスと、マウス脳継代ウイルスの E 蛋白領域のウイルスゲノムの配列、そのアミノ酸配列を比較することにより検討した。

6) ワクチン生産のための、新しいウイルス精製法の開発には、ハイドロキシアパタイトセラミックス (HAC) を用いた。大きさは  $40\mu$  の粒子結晶で、粒子の大きさが揃っている近年開発されたものである。

焼結温度  $400^{\circ}\text{C}$  (HA1) と  $1000^{\circ}\text{C}$  (HA2) の 2 種類の HAC を用い比較した。直径  $8\text{mm}$ 、長さ  $20\text{mm}$  の大きさのカラムに HA1 及び HA2 をそれぞれ充鎮したカラムを作製した。精製材料は、 $\text{pfu} \cdot 7 \times 10^8 / 100\mu\text{l}$  の感染価を持つ 10% マウス脳乳剤をモデルとして用いた。組織培養濃縮ウイルスについては次回に行うことにした。方法は、マウス脳 10% 乳剤  $100\mu\text{l}$  をカラムにのせた後、始めは  $10\text{mM}$  の  $\text{PH}7.0$  の燐酸緩衝液を流速  $0.5\text{ml}/\text{分}$  で 5 分間流し、次いで  $10\text{mM}$  から  $400\text{mM}$  の濃度勾配で燐酸緩衝液を流し、HAC からの蛋白遊出を行い、排出液を  $1\text{ml}$  ずつ分画収集した。これらは、感染価及び蛋白量を測定し、さらに SDS 電気泳動により精製度を確認した。

## C. 研究結果

### 1) 系統の異なる Vero 細胞における日本脳炎ウイルスの増殖性

ワクチン製造に適した Vero 細胞を決める為に、北京株、中山株を用いて、ウイルスを接種される細胞数に対する接種ウイルス量の比（感染多重度：MOI）を 0.1 に設定して、各 Vero 細胞に感染させた。経時的にサンプリングした培養上清のウイルス量を測定した（表 1、2）。北京株では、JCRB 9013、ATCC 由来 JWCB 002 細胞でのウイルス増殖が優れていたが、中山株では ATCC 由来 JWCB 002 が優れていた。

### 2) 細胞のウイルス感受性

北京株、中山株を用いて、 $1 \times 10^{-7}$  に希釈したウイルス液を、各 Vero 細胞に接種し、1%メチルセルローズを用いたプラークアッセイを行い、6日間培養後のプラーク数を比較した（表 3）。プラーク数の多い細胞は JCRB 0111 と ATCC 由来 JWCB 002 細胞であったことから、これら細胞はウイルス感受性に優れていると思われる。

### 3) ATCC 由来 Vero 細胞を用いたウイルス至適増殖条件の検討

ウイルス増殖性、ウイルス感受性に優れた ATCC 由来 Vero 細胞を用いて、細胞に接種するウイルス量を MOI 100 から 0.01 まで変えて細胞に接種し、感染後 7 日までの培養上清についてウイルス量（PFU）、HA 価、抗原価を

測定した。（表 4）測定結果から至適ウイルス接種量は、MOI 100 から 0.1 の範囲で差が認められず、感染後 4・5 日に培養上清を回収すれば良いことがわかった。

### 4) Vero 細胞で増殖させたウイルスとマウス脳由来ウイルスの遺伝学的解析

Vero 細胞で 5 代継代を繰り返した北京株とマウス脳で継代した北京株について、ウイルスの E 蛋白領域の塩基配列とアミノ酸配列を比較した。（図 1? 3）その結果、塩基配列では 4 カ所に違いが見られ、アミノ酸配列では 2 カ所に変化が認められた。二つのウイルスの塩基配列及びアミノ酸配列の一致率は 99% であり、大きな変化は認められなかった。

### 5) ワクチン生産のための新しいウイルス精製法の開発

新しく開発されたヒドロキシアパタイトセラミックス（HAC）を用いて日本脳炎ウイルス感染マウス脳 10% 乳剤をモデルに精製を試みた。焼結温度 400°C の（HA1）カラムは、分画 No. 6 で見ると、焼結温度 100°C（HA3）のカラムと比較したとき、蛋白量が高いことから蛋白吸着性に優れていることが判った。しかし、分画 No. 8、9 のウイルス画分のウイルス吸着性には相違が認められないことから、HA3 のカラムが有望と思われた。（図 4、5）SDS 電気泳動の成績から、No. 8 の分画にはウイルスの E 蛋白が認め

たれ、精製されていることが裏付けられた。ウイルス回収率は、HA 1で81%、HA 2で76%であった。

#### D. 考察

日本脳炎ウイルスの増殖に適したVero細胞は、すでに不活化ポリオワクチンとして実用化されている。ウイルス抗原を多く産生することと、この細胞の安全性の面からWHOもワクチン製造用細胞として認めている。我々は、Vero細胞を用いた不活化日本脳炎ワクチンの開発を目的に基礎的な検討を行った。

Vero細胞には、種々の系統がありそれぞれの細胞を用いウイルスの増殖生、感受性を調べたところ、5種類のVero細胞の中でATCC由来Vero細胞が優れていた。ウイルスの増殖性からワクチン製造に適していると思われた。マイクロキャリアを用いた細胞の大量培養による不活化日本脳炎ワクチン生産は、すでに日本では数社が試みており、実用化も間近いと思われる。我々のこれら成績は、ワクチン開発メーカーの成績を裏付けるものであった。日本脳炎ウイルスは、継代細胞で培養すると容易に性状が変化するというCao J Xらの報告(1995)があるが(報告で用いた細胞はHela細胞である。)我々は、Vero細胞で5代継代したウイルスを用い、マウス脳継代ウイルスと比較したが、塩基配列で4カ所、アミノ酸配列で2ヶ所の変化しか認めず、一致率は99%であった。しかし、抗原性にこの変化がどの様に影響する

かは、未知数である。したがって、この点についてはこれからも検討の必要がある。

ハイドロキシアパタイトセラミックスを用いたウイルスの精製法は、簡易で、一段階での精製法としては、回収率の高いことから今までに無い画期的な精製法である。ワクチンのみならず、精製抗原を用いる体外診断薬の分野にも、応用が可能であり、ワクチンでは日本脳炎以外のウイルスワクチンに用いることで精製度の高いワクチンの改良に役立つと思われる。組織培養不活化日本脳炎ワクチンの製造では、大量の細胞増殖をする過程で用いる細胞培養液は、10%の牛胎児血清を含んでおり、ウイルス接種後は血清を含まない培地に換えて培養を行うが、ウイルス増殖後の大量の培養上清中にはそれでもかなりの血清成分が含まれている。限外ろ過法、ゾナル超遠心機によるショ糖密度勾配法を組み合わせても、完全に除くのは難しい。ワクチンに血清成分が含まれた場合、ヒトでのアナフィラキシー反応がワクチンの副反応として現れることが予想されるからである。組織培養ワクチン開発には、この問題が重要である。我々の開発したハイドロキシアパタイトセラミックスカラムを組織培養ワクチンの精製法の一部に組み込むことにより、さらに安全な組織培養不活化日本脳炎ワクチンを開発できると考える。今回は、ウイルス感染マウス脳10%乳剤を試したが、次回は組織培養ウイルス液の精製に応用する予定である。

## E. 結論

1) 組織培養不活化日本脳炎ワクチンの製造に用いる培養細胞は、謎入ウイルスの無い、ウイルス感受性、ウイルス増殖性に優れたATCC由来のVero細胞が適していた。

2) このATCC由来Vero細胞に感染させる北京ウイルスの最適MOIは、100から0.1まで成績に大きな差を認めなかった。

3) 培養上清のウイルス回収時期は、感染後4?5日が適当であった。

マウス脳継代ウイルスを、Vero細胞で5代継代した北京株について、ウイルスのE蛋白領域の遺伝子分析を行った結果、塩基配列で4ヶ所、アミノ酸配列

で2ヶ所に変化が見られた。

4) E蛋白領域全体の一致率は塩基配列で99%、アミノ酸配列でも99%で良く一致していたが、抗原性、免疫原性については、今後検討の必要がある。

5) ハイドロキシアパタイトセラミックスを用いたカラムによる、日本脳炎ウイルス感染マウス10%乳剤の精製を試みたところ、一段精製だけで高度に精製されたウイルスを得ることが出来た。この方法でのウイルス回収率は高く、組織培養ワクチンのウイルス精製法としても有用と思われた。

表 1

## 各Vero細胞におけるJ Eウイルスの増殖性

## V e r o細胞

1. 9013	P#134	$4 \times 10^5$ cell/ml
2. 0111	P#125	5% CO <sub>2</sub> 37°C 4日間培養
3. 9007	P# 37	
4. NIID	P#268	
5. ATCC	P#145	

J Eウイルス：北京株、中山株 Moi 0.1で感染

## 結果

## 北京株

Vero細胞		感染後日数				
		3	4	5	6	7
1. 9013	CPE	—	—	+	++	++
	pfu/ml		$1.1 \times 10^8$		$1.4 \times 10^7$	$1.0 \times 10^7$
2. 0111	CPE	—	—	+	+++	+++
	pfu/ml		$2.5 \times 10^7$		$1.6 \times 10^6$	$1.1 \times 10^6$
3. 9007	CPE	±	+	+++	+++	+++
	pfu/ml		$7.5 \times 10^7$		$6.3 \times 10^6$	$6.3 \times 10^6$
4. NIID	CPE	±	+	++	++	++
	pfu/ml		$0.5 \times 10^7$		$2.3 \times 10^6$	$8 \times 10^5$
5. ATCC	CPE	±	+	+++	+++	+++
	pfu/ml		$9.5 \times 10^7$		$1.2 \times 10^7$	$9.0 \times 10^6$



表 2

中山株

Vero細胞

感染後日数

		3	4	5	6	7
1.	9013 CPE pfu/ml	-	± $2.0 \times 10^7$	++	++ $3.0 \times 10^7$	+++ $1.5 \times 10^7$
2.	0111 CPE	-	± $3.5 \times 10^7$	±	+ $1.0 \times 10^7$	+ $6.8 \times 10^6$
3.	9007 CPE pfu/ml	±	+ $5.0 \times 10^7$	+++	+++ $1.5 \times 10^7$	+++ $4.3 \times 10^6$
4.	NIID CPE	+	+ $1.0 \times 10^7$	++	+++ $3.7 \times 10^6$	+++ $5.5 \times 10^6$
5.	ATCC CPE pfu/ml	+	+ $7.0 \times 10^7$	+++	+++ $1.5 \times 10^7$	+++ $1.0 \times 10^7$

各Vero細胞を用いたPlaque Assayでのプラーク数の比較

Vero細胞は、 $2 \times 10^5 / \text{ml}$   $3 \text{ ml} / \text{well}$   $\text{CO}_2$   $37^\circ\text{C}$  1日培養  
 ウイルス：北京株、中山株  $1 \times 10^{-7}$ に希釈  $100 \mu\text{l} / \text{well}$ 接種  
 吸着時間：90分 6日間培養後プラーク数を判定した。

結果

表 3

Vero細胞	プラーク数	
	北京株	中山株
1. 9013	95、121、88 106、81、110 平均：100.1	78、87、78 54、64、64 平均：70.8
2. 0111	156、130、164 159、139、154 平均：150.3	112、125、126 117、135、134 平均：124.8
3. 9007	118、116、107 101、91、98 平均：105.1	69、59、52 67、73、75 平均：65.8
4. NIID	116、93、104 111、108、105 平均：106.1	71、91、78 71、67、76 平均：75.6
5. ATCC	139、131、113、 135、122、89 平均：121.5	90、91、92 89、84 平均：89.2

表4 Vero(ATCC) 細胞を用いた日本脳炎ウイルス（北京株）の至適増殖条件

感染後日数	m.o.i	PFU	HA価	抗原価	CPE
		Log10/ml		(ELISA)	
1	100	4.60	2	<2	-
	10	4.65	2	<2	-
	1	4.20	<2	<2	-
	0.1	3.49	<2	<2	-
	0.01	2.77	<2	<2	-
2	100	7.39	128	8	-
	10	7.60	128	8	-
	1	7.45	128	8	-
	0.1	6.88	16	<2	-
	0.01	6.11	<2	<2	-
3	100	8.11	128	16	-
	10	8.08	128	16	-
	1	8.26	128	16	-
	0.1	8.51	128	16	-
	0.01	8.00	64	8	-
4	100	8.26	256	32	±
	10	8.04	256	32	±
	1	8.30	256	64	±
	0.1	8.26	128	16	±
	0.01	8.14	128	16	-
5	100	8.32	512	128	+
	10	8.30	256	64	++
	1	7.90	256	64	++
	0.1	8.18	256	128	++
	0.01	8.08	256	32	+
6	100	8.23	512	64	++
	10	8.18	512	128	++
	1	8.08	256	64	++
	0.1	7.90	256	64	++
	0.01	8.08	256	64	++
7	100	7.72	512	256	+++
	10	7.57	256	64	+++
	1	7.59	256	128	+++
	0.1	7.65	256	64	+++
	0.01	7.81	256	64	+++

図1 Vero細胞で増殖させたウイルスとマウス脳ウイルスの遺伝学的解析  
塩基配列の比較 上段はVero細胞由来ウイルス、下段はマウス由来ウイルス

```

File1: Beijing1-Vero-E
Mode: Normal          1 - 1500
File2: JEV/Beijing1-E
Mode: Normal          1 - 1500

Matching Percentage (Total Window: 99%, Alignment Window: 99%)

  1 AGTTTCAACTGTCTGGGAATGGGCAATCGTGACTTCATAGAAGGAGCCAG      50
    |||
  1 AGTTTCAACTGTCTGGGAATGGGCAATCGTGACTTCATAGAAGGAGCCAG      50

 51 TGGAGCCACTTGGGTGGACTTGGTGCTAGAAGGAGACAGCTGCTTGACAA      100
    |||
 51 TGGAGCCACTTGGGTGGACTTGGTGCTAGAAGGAGACAGCTGCTTGACAA      100

101 TTATGGCAAACGACAAACCAACATTGGACGTCCTCGCATGATCAACATCGAA      150
    |||
101 TTATGGCAAACGACAAACCAACATTGGACGTCCTCGCATGATCAACATCGAA      150

151 GCTGTCCAACCTGCTGAGGTCAGAAGTTACTGCTATCATGCTTCAGTCAC      200
    |||
151 GCTGTCCAACCTGCTGAGGTCAGAAGTTACTGCTATCATGCTTCAGTCAC      200

201 TGACATTTTCGACGGTGGCTCGGTGCCCCACGACTGGAGAAGCTCACAACA      250
    |||
201 TGACATTTTCGACGGTGGCTCGGTGCCCCACGACTGGAGAAGCTCACAACA      250

251 AGAAGCGAGCTGATAGTAGCTATGTGTGCAAACAAGGCTTCACTGATCGT      300
    |||
251 AGAAGCGAGCTGATAGTAGCTATGTGTGCAAACAAGGCTTCACTGATCGT      300

301 GGGTGGGGCAACGGATGTGGACTTTTCGGGAAGGGAAGCATTGACACATG      350
    |||
301 GGGTGGGGCAACGGATGTGGACTTTTCGGGAAGGGAAGCATTGACACATG      350

351 TGCAAAATTCTCCTGCACCAGTAAGGCGATTGGGAGAACAATCCAGCCAG      400
    |||
351 TGCAAAATTCTCCTGCACCAGTAAGGCGATTGGGAGAACAATCCAGCCAG      400

401 AAAACATCAAATACGAAGTTGGCATTTTTGTGCATGGAACCACCACTTCG      450
    |||
401 AAAACATCAAATACGAAGTTGGCATTTTTGTGCATGGAACCACCACTTCG      450

451 GAAAACCATGGGAATTATTCAGCGCAAGTTGGGGCGTCCCAGGCGGCAAA      500
    |||
451 GAAGACCATGGGAATTATTCAGCGCAAGTTGGGGCGTCCCAGGCGGCAAA      500

501 GTTTACAGTAACACCCAATGCTCCTTCGATAACCCTCAAACCTGGTGACT      550
    |||
501 GTTTACAGTAACACCCAATGCTCCTTCGATAACCCTCAAACCTGGTGACT      550

551 ACGGAGAAGTCACACTGGACTGTGAGCCAAGGAGTGGACTAAACACTGAA      600
    |||
551 ACGGAGAAGTCACACTGGACTGTGAGCCAAGGAGTGGACTAAACACTGAA      600

601 GCGTTTTACGTCATGACCGTGGGGTCAAAGTCATTTTTGGTCCACAGGGA      650
    |||
601 GCGTTTTACGTCATGACCGTGGGGTCAAAGTCATTTTTGGTCCACAGGGA      650

651 ATGGTTTCATGATCTCGCTCTCCCTTGGACGTCCTTCGAGCACAGCGT      700
    |||
651 ATGGTTTCATGATCTCGCTCTCCCTTGGACGTCCTTCGAGCACAGCGT      700

701 GGAGAAACAGAGAACTCCTCATGGAATTTGAAGAGGCGCACGCCACAAAA      750
    |||
701 GGAGAAACAGAGAACTCCTCATGGAATTTGAAGAGGCGCACGCCACAAAA      750

```