

厚生省科学研究費補助金

平成11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12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 CTL ワクチン開発の試み：BALB/c マウスにおける防御 CTL エピトープの検索・・・ 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. デング DNA ワクチンの開発：NS3 遺伝子組込み DNA ワクチンのマウスにおける免疫原性・・・ 18
分担研究者：山岡正興（兵庫県立衛生研究所）
4. デングウイルス非構造タンパク NS5 遺伝子組み込み DNA ワクチンの作製・・・ 25
分担研究者：山岡正興（兵庫県立衛生研究所）
5. 日本脳炎ウイルス非構造蛋白 NS1 連続発現細胞クローンの樹立・・・ 30
分担研究者：小西英二（神戸大学医学部 医療基礎学講座）
6. 日本脳炎ウイルス非構造蛋白 NS1 抗体測定系の確立・・・ 39
分担研究者：小西英二（神戸大学医学部 医療基礎学講座）
7. 新しい日本脳炎ワクチンの開発：
植物発現ベクターによる日本脳炎ウイルス抗原の発現・・・ 47
主任研究者：倉根一郎（国立感染症研究所 ウイルス第一部）
8. Vero 細胞を用いた細胞培養不活化日本脳炎ワクチンの開発に関する研究・・・ 53
分担研究者：中山幹男（国立感染症研究所 ウイルス第一部）
9. デングウイルス感染症の診断法の確立（3）・・・ 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）
10. 黄熱ワクチン接種日本人における抗体上昇について・・・ 75
分担研究者：高崎智彦（国立感染症研究所 ウイルス第一部）
11. シンドビスウイルスレセプターの検出・・・ 79
主任研究者：倉根一郎（国立感染症研究所 ウイルス第一部）

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。本年度の研究においては以下の点が明らかとなった。（１）デングウイルス 2 型の非構造タンパク NS3 遺伝子を pcDNA3 ベクターに組み込んだ pcD2NS3 を作製し、マウスを用いて免疫誘導能と防御効果について検討した。3 回筋注して免疫した。初回接種から 4 週間後、血清中に NS3 に対する抗体の誘導を確認できた。しかし、致死量のウイルスチャレンジにおいては防御効果を認めなかった。さらに、同候補として pcDNA3 ベクターに、デングウイルス 2 型の非構造タンパク NS5 遺伝子を組み込んだ pcD2NS5 を作製した。pcD2NS5 のデングウイルス遺伝子カセットが正しく組み込まれていることを確認した。（２）CTL による防御免疫を誘導する日本脳炎 DNA ワクチンの開発を目的に、防御 CTL エピトープの検索を行った。E 蛋白前半部に存在する CTL エピトープを用いて、ユビキチンの CTL 誘導促進効果をわずかながら認めた。しかし、ユビキチンによる防御効果の増大は認められなかった。C、NS2a または NS3 組込みプラスミドにより免疫したマウスにおいて CTL 活性が検出され、これらの蛋白に CTL エピトープが存在することが示された。しかし、致死量の攻撃からの防御は認められなかった。以上の結果は、これら 3 種のウイルス蛋白に CTL エピトープが含まれるが防御免疫誘導には十分な免疫原性を有しないことを示す。（３）日本脳炎ウイルス非構造蛋白 NS1 を発現する持続発現細胞クローンを得た。この細胞を用いた高感度の系においてヒト血清または血漿を対象として NS1 抗体価を測定した結果、患者の検体においては 1:640 から 1:1280 の抗体価、一方健常人においては 1:40 未満の抗体価であり、明確な差が認められた。この測定系は、現行ワクチンの防御機構解明や新型ワクチンの開発に有用と考えられる。（４）これまでに作製した日本脳炎ウイルス preM, E を含む DNA ワクチンのカニクイザルにおける防御免疫誘導能の検討を開始した。

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）

向井隼三郎（国立感染症研究所 霊長類センター 主任研究官）

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) ウイルス：デングウイルス 2 型 NGC 株をワクチンプラスミドの構築およびマウス実験における免疫原として用いた。また、デングウイルス 2 型トリニダット TR1751 株をマウス実験における攻撃ウイルスとして用いた。いずれの 2 型株もマウスの脳内で継代されたものを用いた。

(2) デングウイルス NS3 遺伝子 DNA の増幅：すでにクローン化されているデングウイルス 2 型ニューギニア C 株の NS3 領域を含むプラスミド PLZNS3 をテンプレートとした。センスプライマー (MY12) は、NS3 の 5' 末端に開始コドン ATG を置き、さらにその上流に切り出し用の Eco RV を付加して作製した。また、アンチセンスプライマー (MY13) は、NS3 コード領域の 3' 末端に停止コドンと切り出し用に Xba I 配列を入れて作製した。増幅された遺伝子を市販の pcDNA3 の Eco RV/Xba I サイトに挿入してプラスミド pcD2NS3 を作製した。

(3) デングウイルス NS5 遺伝子 DNA の増幅：すでにクローン化されているデングウイルス 2 型ニューギニア C 株の NS5 領域を含むプラスミド pcMVNS5 をテンプレートとした。ベクターとしてサイトメガロウイルスの強力プロモーターおよびウシ成長ホルモン由来のポリ A 配列付加シグナルを含む市販の

pcDNA3 (Invitrogen) を用いた。作製したプラスミドは、コンピテント細胞に大腸菌 DH5 を用いてトランスフォームさせた後、常法にしたがってコロニーを 2 回単離し、2xYT 培地で増殖させた。

(4) 日本脳炎ウイルス遺伝子組込みプラスミドの作製：JEV 中山株の C、NS2a、NS3 遺伝子を、それらの遺伝子を含むクローン化 cDNA を鋳型として、Taq DNA ポリメラーゼを用いて PCR により増幅した。PCR は、GeneAmp PCR System を用いて行った。増幅された遺伝子 DNA の 5' 末端には EcoRI サイトが、3' 末端には TAA の停止コドン及び XbaI サイトが含まれるようにプライマーを設計した。E1 遺伝子については、すでに作製している pcJEE1 (E1 を組込んだ pcDNA3 :) から EcoRI 及び XbaI を用いて E1 を切り出して pUBIQ に組込むことにより作製した。

日本脳炎 NS1 発現プラスミドの構築のため NS1-NS2a 蛋白コード領域の遺伝子を含むクローン化 cDNA を鋳型とし、上記の 4 種の遺伝子を PCR により増幅した。EcoRI/XbaI サイトを用いて pcDNA3 に組込み、4 種のプラスミドを構築した。pJEss15NS1 及び pJEss15NS1-NS2a は、NS1 上流にシグナル配列となるアミノ酸を 15 個付加したものであり、pJEss20NS1 及び pJEss20NS1-NS2a は、NS1 上流に 20 個のアミノ酸を付加したものである。また、pJEss15NS1-NS2a 及び pJEss20NS1-NS2a は、NS1 の下流に NS2a を付加したものである。これらのプラスミド DNA を DH5 細胞を用いて増幅し、ポリエチレングリコール沈殿法により精製した。

(5) ユビキチン組込みプラスミドベクター (pUBIQ)：pGEM3 をベースにして、発現量を高めるためにサイトメガロウイルスの強力

プロモーターやウシ成長ホルモン由来のポリ A 配列付加シグナルをすでに組込んだプラスミド (pGEM3IMA) に、BALB/c マウスのユビキチン遺伝子を組込んだ。ユビキチン遺伝子は、BALB/c マウスの脾臓細胞から抽出したゲノム DNA を鋳型にして、PCR によりクローン化したものである。

(6) マウスの免疫：雌 Balb/c マウスを 4 グループに分け、グループあたり 5 匹ずつ用いた。免疫原は、pcD2NS3 あるいは pcDNA3 ベクターで、1 回 100 ug を用いた。これらの免疫原をマウスの尾根部に 5 週令から 2 週間隔で 3 回筋肉内接種した。また、3x10⁶PFU/one shot の NGC 株あるいは PBS をプラスミドと同様に 3 回マウス尾根部に筋肉内接種した。

日本脳炎プラスミド DNA によるマウスの免疫は精製 DNA を PBS に希釈して、6 週齢から 7 週齢の雄 BALB/c マウスに筋肉内接種した。左右の大腿四頭筋にそれぞれ 50ug、合計 100ug を 1 匹あたりに接種した。接種間隔を 2 週間以上として、1 回から 3 回免疫した。

(7) デングウイルス NS3 発現 DNA による免疫誘導の検討：マウスに初回免疫後、グループごとに採血した 2 週目および 4 週目のプール血清について、デングウイルス NS3 に対する免疫をデングウイルス 2 型 NGC 株の NS3 の持続発現細胞を用いて測定した。この細胞は、ほぼ 80%が NS3 を発現する。マウス血清中の NS3 に対する免疫は、この持続細胞を固定し、FITC 標識抗マウス IgG 抗体を用いた蛍光抗体法で測定した。防御免疫の誘導：4 グループのマウスにそれぞれ 3 回免疫 (9 週令) 完了後、2 週間目 (11 週令) に、3.2 HAU の トリニダッド TR1751 株を脳内に 0.2 ml ずつ接種して攻撃した。攻撃後 14 日間マウスの

生死と病気の進行状況を観察した。

(8) CTL 試験：最終免疫から 2 週間後、免疫マウスの脾臓を採取し、単細胞とした後 10%ウシ胎児血清及び 50 μ M β -メルカプトエタノールを含有する RPMI-1640 培養液に浮遊した。この脾臓細胞を、1:8 希釈の JEV を含む上記 RPMI 培養液で 5 日間培養することにより刺激した。これらの脾臓細胞は 1x10⁶ 細胞/ml の濃度に浮遊した後、U 型 96 穴マイクロプレートにウエルあたり 100 μ l ずつ分注した。標的細胞である感染及びモック感染 3T3-3 細胞をエフェクター：ターゲット (E:T) 比が 10:1 または 20:1 になるように浮遊液を作製し (1x10⁵ または 5x10⁴ 細胞/ml)、その 100 μ l を脾臓細胞に混合した。反応は 37°C で 6 時間行った。傷害を受けた細胞から放出される乳酸デヒドロゲナーゼ量を Cytotoxicity Detection Kit (LDH) を用いて測定した。

(9) NS1 抗体測定法：クローン化した NS1 連続発現 CHO-K1 細胞と、NS1 非発現 CHO-K1 細胞を 96 穴マイクロプレートに入れ (ウエルあたり各々 8.5x10² 細胞)、コロニーを形成するまで 3~4 日培養した。PBS で洗浄した後、アセトン・メタノール (1:1) で固定した。NS1 遺伝子組込みワクシニアウイルス感染 HeLa 細胞抗原は、96 穴マイクロプレートに生育した HeLa 単層細胞に、組換えウイルスを感染させ、6 時間培養後エタノールで固定して作製した。抗原プレートを、あらかじめ 2 次抗体と同種の血清によりブロッキングした。その後、検体 (希釈血清または血漿) と 30 分間反応させ、次いでビオチン標識抗ヒト IgG または抗マウス IgG (2 次抗体) と 30 分間反応させた。さらに、ABC 試薬 (アビジン・ビオチン標識パーオキシダーゼ複合体、

Vector 社製) と 30 分間反応させ、最後に基質である VIP (Vector 社製) により染色した。

C. 研究結果

(1) デングウイルス NS3 遺伝子組込み DNA ワクチンの免疫原性：

100 μ g の pcD2NS3 を 5 週令の雌 Balb/c マウスの尾根部の筋肉内に 2 週間隔で 3 回接種し、デングウイルスの NS3 に対する免疫を、デングウイルス 2 型 NGC 株の NS3 遺伝子持続発現細胞 L929 を用いた蛍光抗体法で測定した。初回免疫後 2 週目に抗 NS3 抗体は認められなかったが、4 週目に 20 倍の抗 NS3 抗体の誘導が認められた。対照グループにおいては抗 NS3 抗体は誘導されず、NGC 株で免疫したマウスには初回免疫から 4 週目にはじめて 80 倍の抗 NS3 抗体が誘導された。次に、5 週令の Balb/c マウスに 100 μ g の pcD2NS3 を 2 週間隔で 3 回免疫後、2 週目に NGC 株と同じデングウイルス 2 型のトリニダット TR1751 株で攻撃した。デングウイルス NS3 遺伝子組込み DNA ワクチンによる防御は認められなかった。

(2) デングウイルス NS5 遺伝子組込み DNA ワクチンの作製：デング DNA ワクチンの候補として市販の pcDNA3 ベクターにデングウイルス 2 型ニューギニア C 株の非構造タンパク NS5 遺伝子約 2700bp を組み込んだ pcD2NS5 を作製した。開始コドン上流に ACC 配列を置くなどをして、発現量を高める工夫をした。DEN ウイルスの NS5 遺伝子約 2700bp は、PCR による読み間違いを避けるために修復機能のある DNA ポリメラーゼを選び、通常より少ないサイクルで増幅した。pcD2NS5 のデングウイルス遺伝子カセットが正しく組み込まれていることを、シーケンシングに

よって確認した。今後はこの NS5 遺伝子組込み DNA ワクチンの免疫誘導能について検討する予定である。

(3) BALB/c マウスにおける日本脳炎ウイルス防御 CTL エピトープの検索：

(a) CTL エピトープが存在する E1 の遺伝子とユビキチン遺伝子を組込んだ pUJEE1 及び E1 遺伝子を含むがユビキチン遺伝子を含まない pJEE1 を用い、ユビキチンの CTL 誘導促進効果を調べた。いずれのプラスミドにおいても 1 回免疫によっては CTL 活性が検出できなかった。しかし、2 回免疫後には、pUJEE1 及び pJEE1 接種マウスにおいて高い特異 CTL 活性が認められた。この結果から、E1 における CTL エピトープの存在が確認された。また、ユビキチンにより CTL 誘導が促進された。

(b) 致死量の攻撃からの防御に及ぼすユビキチンの効果を調べるために、pUJEE1、pJEE1 または pUBIQ による 3 回免疫マウス 2 匹を 1×10^6 LD50 の、さらに 2 匹のマウスを 5×10^5 LD50 の JEV P3 株で攻撃し、生存状況を観察した。pUBIQ 免疫マウスはウイルス接種後 14 日までに全て死亡し、平均生存日数は、8.3 日だった。pUJEE1 は 1 匹のみ 21 日間生存し、平均生存日数は 11.3 日であり、pJEE1 は 2 匹が観察期間生存し、平均生存日数は 14.3 日間であった。以上の結果により、E1 に存在する CTL エピトープは 3 回免疫により防御的に働くことが示唆された。しかし、防御に及ぼすユビキチンの促進効果は確認できなかった。

(c) C、NS2a 及び NS3 における CTL エピトープの存在を調べるために、各グループ 2 匹の BALB/c マウスを pUBIQ、pUJEC、pUJENS2a または pUJENS3 により 2 回または 3 回免疫し、CTL の誘導を調べた。3 回免疫マウスにはい

ずれの JEV 遺伝子を導入したグループにおいて高い CTL 活性を認めた。これらの結果から CTL エピトープは C、NS2a、NS3 のいずれにも存在することが明らかにされた。C、NS2a または NS3 により誘導された CTL の防御効果を調べるために、各グループ 2 匹の BALB/c マウスを pUBIQ、pUJEC、pUJENS2a または pUJENS3 により 3 回免疫した後に、致死量の JEV を接種し、生存状況を観察した。C、NS2a、NS3 により誘導された CTL はマウスを防御しなかった。

(4) 日本脳炎ウイルス非構造蛋白 NS1 連続発現細胞クローンの樹立：

CHO-K1 細胞に pJEss15NS1 または pJEss20NS1 をトランスフェクトし 24 時間後に HMAF を用いて免疫染色した結果、発現がそれぞれ約 3% または約 7% の細胞に見られた。しかし、pJEss15NS1-NS2a 及び pJEss20NS1-NS2a には発現が認められなかった。pJEss20NS1 をトランスフェクトした CHO 細胞から G418 を用いて発現細胞を選択したが、10 回の継代後においても発現率が 20% にとどまった。G418 によっては効果的に発現細胞が選別できなかったため、次に限界希釈法により発現細胞株のクローニングを行った。その結果、1 回のクローニングにより、発現率は 70~80% に上昇した。

(5) 日本脳炎ウイルス非構造蛋白 NS1 抗体測定系の確立：

NS1 連続発現細胞を用いて感度高く NS1 抗体価が測定できるかどうかを調べるために、NS1 遺伝子組込みワクシニアウイルス感染 HeLa 細胞を抗原とした測定系と比較した。NS1 連続発現細胞を抗原とした測定法は、マウスにおける攻撃後の NS1 抗体価の上昇を捉えることができ、ワクシニアウイルス感染細胞を

抗原とした NS1 抗体測定法と同等またはそれ以上の感度であることが示された。タイ患者血漿 4 検体、及びアメリカ健康人血清 3 検体を、1:5 から 2 倍階段希釈し、NS1 抗体価を測定した。タイ患者血漿においては、1:40 から 1:2560 希釈まで NS1 発現細胞と非発現細胞との染色強度に明確な差を認めた。

D. 考察

ウイルス特異的キラー T 細胞は日本脳炎の回復に重要な役割をはたしていると報告されている。デングウイルスと同じフラビウイルス属に分類される JEV の prM/E 遺伝子カセットを用いた DNA ワクチンの防御免疫誘導能をマウスモデルを用いて解析してきた一連の研究から、日本脳炎に対する防御には中和抗体が重要であることが示されたが、それと同時に日本脳炎ウイルス特異的キラー T 細胞が誘導されることも明らかになった。一方、prM/E 遺伝子カセットを組み込んだデング DNA ワクチンの評価では、中和抗体および記憶 B 細胞誘導能は示されたもののデングウイルス特異的キラー T 細胞の誘導は明確にはされなかった。しかし、デングウイルスに対するワクチンにおいては、液性免疫と同時に細胞性免疫を誘導することが必要とされ、デングウイルス感染においては非構造タンパクである NS3 T 細胞が認識するエピトープを多く持つことが報告されている。本年の研究で NS3 を組込んだプラスミドについてマウスで検討したところ、NS3 遺伝子のマウスにおける免疫原性が明らかにされた。しかし、NS3 免疫マウスに明確な防御免疫を見出せなかった。そこで、NS3 と共に CTL 活性を誘導するとされる NS5 についてデングウイルス特異的キラー T 細胞が誘導されるか否

か検討すると共に、CTL 活性が防御に有利に作用するの否か解析する予定である。

ユビキチンによる CTL 誘導促進効果が 2 回免疫後にわずかに認められたが、防御におけるユビキチンの効果は確認できなかった。他のウイルスにおいては CTL 誘導及び防御共に増強効果が報告されているので、実験系の工夫により効果が明確に見られる可能性がある。E1 に存在する CTL エピトープは、攻撃後のマウスの平均生存日数を増加させた。この CTL エピトープは防御的に働くことを示唆する。また、pUJEC、pUJENS2a または pUJENS3 による 3 回免疫マウスにも CTL 活性が認められた。しかし、致死量の攻撃からの防御は認められなかった。むしろ生存日数は短くなり、C、NS2a、NS3 の CTL エピトープは致死量の攻撃から防御する程の CTL を誘導しなかったと考えられる。

本研究は C、NS2a、NS3 を対象に CTL エピトープの検索を行なったが、防御をもたらす強い CTL エピトープは見出すことができなかった。しかし、JEV 感染マウスに誘導された CTL の移入によりマウスを致死量の攻撃から防御することが報告されており、他の遺伝子領域に防御 CTL エピトープが存在すると考えられる。防御 CTL エピトープの検討は、DNA 免疫をベースとした日本脳炎 CTL ワクチンの開発に寄与する。

E. 結論

本年度の研究においては以下の点が明らかとなった。(1) デングウイルス 2 型の非構造タンパク NS3 遺伝を組み込んだ DNA ワクチンにより血清中に NS3 に対する抗体の誘導を確認できた。しかし、防御効果を認めなかった。さらに、同候補としてデングウイ

ルス NS5 遺伝子を組み込んだ DNA ワクチンを作製した。pcD2NS5 のデングウイルス遺伝子カセットが正しく組み込まれていることを確認した。(2) CTL による防御免疫を誘導する日本脳炎 DNA ワクチンの開発を目的に、防御 CTL エピトープの検索を行った。E 蛋白に存在する CTL エピトープを用いて、ユビキチンの CTL 誘導促進効果をわずかながら認めたが、防御効果の増大は認められなかった。C、NS2a または NS3 組込みプラスミドにより免疫したマウスにおいて CTL 活性が検出された。しかし、防御効果は認められなかった。(3) 日本脳炎ウイルス非構造蛋白 NS1 を発現する持続発現細胞クローンを得た。この細胞を用いてヒト血清または血漿中の NS1 抗体価を測定した結果、患者の検体においては 1:640 から 1:1280 の抗体価、一方健常人においては 1:40 未満の抗体価であり明確な差が認められた。この測定系は、現行ワクチンの防御機構解明や新型ワクチンの開発に有用である。(4) また、これまでに作製した日本脳炎ウイルス preM, E を含む DNA ワクチンの防御免疫誘導能の、カニクイザルを用いての検討を開始した。

F. 研究発表

1. 論文発表

Yamada, K., Takasaki, T., Nawa, M., and Kurane I. : Laboratory diagnosis of imported dengue cases. *Japanese Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 27:75-77, 1999.

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 acute dengue illness is related to development of plasma leakage and disease severity. *Journal of Infectious Diseases*. 179:755-762, 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*. 27:81-83, 1999.

Konishi, E., Yamaoka, M., Win, K.-S., 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*. 73:5527-5534, 1999.

Yamada, K., Nawa, M., Takasaki, T., Yabe, S., and Kurane, I. : Laboratory diagnosis of dengue virus infections by reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) and IgM-capture enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Japanese Journal of Infectious Diseases*. 52 :150-155, 1999

Mathew A. Kurane, I., Green, S., Vaughn, D.W., Kalayanarooj, S., Suntayakorn, S., Ennis, F.A. and Rothman, A.L. : Impaired T cell proliferation in acute dengue

- infection. *Journal of Immunology*. 162 :5609-5615, 1999.
- Green, S., Pichyangkul, S., Vaughn, D.W., Kalayanarooj, S., Nimmannitya, S., Nisalak, A., Kurane, I., Rothman, A.L., and Ennis, F.A. : Early CD69 expression on peripheral blood lymphocytes from children with dengue hemorrhagic fever. *Journal of Infectious Diseases*. In press. 1999.
- Konishi, E., Yamaoka, M., Kurane, I., and Mason, P.W. : A DNA vaccine expressing dengue type 2 virus premembrane and envelope genes induces neutralizing antibody and memory B cells in mice. *Vaccine* In press. 1999
- Masaki, H., and Kurane, I. : Induction of cytotoxic T lymphocytes of heterogeneous specificities by immunization with a single peptide derived from influenza virus. *Viral Immunology*. In press. 2000
- Konishi, E., Kurane, I., and Mason, P.W. : Immune response to traditional and genetically engineered Japanese encephalitis vaccines. *Recent Research Development in Virology*. In press 2000
- Takada, K., Masaki, H., Konishi, E., Takahashi, M., and Kurane, I. : Definition of an epitope on Japanese encephalitis virus (JEV) envelope protein recognized by JEV-specific murine CD8+ cytotoxic T lymphocytes. *Archives of Virology*. In press. 2000
- Aihara H., Takasaki T., Toyosaki-Maeda T., Suzuki R., Okuno Y., Kurane I. : T cell activation, and induction of antibodies and memory T cells by immunization with inactivated Japanese encephalitis vaccine. *Viral Immunology*. In press. 2000
- Kurane, I., and Takasaki, T. : Immunogenicity and protective activity of the current inactivated Japanese encephalitis vaccine against different Japanese encephalitis virus strains. *Vaccine* In press 2000
- Konishi, E., Yamaoka, M., Kurane, I., and Mason, P.W. : Japanese encephalitis DNA vaccine candidates expressing premembrane and envelope genes induce virus-specific memory B cells and long-lasting antibodies in swine. *Virology*. In press 2000.

2. 学会発表

Konishi E., Yamaoka M., Khin Sane Win, Takada K., Kurane I. and Mason P. W. : DNA vaccines for dengue and Japanese encephalitis. *International Seminar on Dengue Fever/Dengue Haemorrhagic Fever*. Surabaya, Indonesia (1999) .

小西英二、山岡政興、倉根一郎 : 日本脳炎 DNA ワクチンのブタにおける抗体誘導能。第 47 回日本ウイルス学会学術集会・総会 (1999)。

藤井敦子、鳥谷朋美、小西英二：日本脳炎ウイルス細胞外粒子を産生する細胞クローンの樹立。第 47 回日本ウイルス学会学術集会・総会（1999）。

Konishi, E. : Development of DNA vaccines for Japanese encephalitis and dengue. Frontiers of RNA virus research II, Kyoto, Japan (2000) .

江下優樹、長谷部 太、山田堅一郎、五十嵐 章：臨床症状の異なる患者かられたデングウイルスの媒介蚊体内での増殖。第 51 回日本衛生動物学会大会、1999.

山田堅一郎：デング熱／デング出血熱に関する最近の研究。第 51 回日本衛生動物学会大会、生理分子生物懇談会、1999.

山田堅一郎、高崎智彦、矢部貞雄、名和 優、倉根一郎：デングウイルス感染症の診断法について。第 34 回日本脳炎ウイルス生態学研究会、1999.

山田堅一郎、高崎智彦、矢部貞雄、名和 優、倉根一郎：デングウイルス感染症の実験室診断—解熱日と各診断法との関連—。第 40 回日本熱帯医学会、1999.

井戸田一朗、増田剛太、味澤 篤、今村顕史、根岸昌功、山田堅一郎、高崎智彦、矢部貞雄、倉根一郎：輸入デング感染症 44 例の検討。第 40 回日本熱帯医学会、1999.

手登根 稔、平田晴男、徳山清之、山田堅一郎、倉根一郎：デングウイルス感染を契機に発症したと思われた VAHS の一症例。第 41 回日本臨床血液学会総会、1999.

名和 優、山田堅一郎、倉根一郎、保井孝太郎：日本脳炎ウイルスのベクターとして重要な蚊由来 C6/36 細胞におけるウイルス感染機構。第 47 回ウイルス学会学術集会総会、1999.

山田堅一郎、高崎智彦、名和 優、倉根一郎：デング熱患者におけるウイルス血症と抗体反応の解析。第 47 回ウイルス学会学術集会・総会、1999.

分担研究報告書

日本脳炎CTLワクチン開発の試み： BALB/cマウスにおける防御CTLエピトープの検索

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

研究要旨 現行の日本脳炎不活化ワクチンは誘導された中和抗体により発症を防御する。一方、防御免疫における細胞傷害性Tリンパ球（CTL）の重要性も認識されてきた。本研究はCTLによる防御免疫を誘導する日本脳炎ワクチンの開発を目的に、3種のウイルス蛋白（C、NS2a、NS3）を対象とした防御CTLエピトープの検索を、BALB/cマウスを用いたDNA免疫により行った。ベクターとして、マウスユビキチン遺伝子が共発現するように設計したプラスミドを用いた。E蛋白前半部（E1）に存在するCTLエピトープを用いて、ユビキチンのCTL誘導促進効果をわずかながら認めた。E1組込みプラスミドにより2回免疫したマウスにおいて、攻撃後の平均生存日数は増加したが、ユビキチンによる防御効果の増大は認められなかった。C、NS2aまたはNS3組込みプラスミドにより3回免疫したマウスにおいてCTL活性が検出され、これらの蛋白にCTLエピトープが存在することが示された。しかし、致死量の攻撃からの防御は認められなかった。以上の結果は、これら3種のウイルス蛋白にCTLエピトープが含まれるが防御誘導に十分な強さでないことを示す。JEV感染マウスに誘導されたCTLの移入により、マウスが致死量の攻撃から防御されることが報告されており、強い防御CTLエピトープはC、NS2a及びNS3以外のJEV蛋白に存在すると考えられる。

A. 研究目的

日本脳炎患者は、年間1万人に昇り、ワクチンによる予防の重要性は高い。現行の日本脳炎ワクチンは不活化ワクチンであり、防御免疫は中和抗体を主体とする。一方、マウスを用いた移入実験において細胞傷害性Tリン

パ球（CTL）の防御能力が報告され、CTLも中和抗体同様、防御免疫として重要であると考えられてきた。しかし、日本脳炎ウイルス（JEV）においてどのCTLエピトープが防御に関わるかはまだ明らかにされていない。防御CTLエピトープの決定は、

その遺伝子がCTLを効果的に誘導するDNAワクチンに利用でき、CTLワクチン開発の道が開ける点で極めて重要である。

JEVのゲノムには、5'側より構造蛋白のコア蛋白 (C)、前駆膜蛋白 (prM)、外被膜蛋白 (E)、次いで非構造蛋白 (NS1、NS2a、NS2b、NS3、NS4a、NS4b、NS5) の遺伝子がコードされている。この内、prM及びE領域については調べられており、CTLエピソードはEの前半部 (E1) に存在する (Konishi et al., *Journal of Virology* 73, 5527-5534, 1999)。本研究では、細胞内蛋白輸送物質でありCTL誘導促進効果をもつとされるユビキチンを組込んだプラスミドベクターを用いて、JEVゲノム上のC、NS2a、NS3遺伝子を対象として、防御CTLエピソードの検索を行った。

B. 研究方法

ユビキチン組込みプラスミドベクター (pUBIQ) : 詳細は昨年と同研究班分担研究報告書『マウスユビキチン搭載プラスミドベクターの構築』に記載した。pGEM3 (プロメガ社製) をベースにして、発現量を高めるためにサイトメガロウイルスの強力プロモーターやウシ成長ホルモン由来のポリA配列付加シグナルをすでに組込んだプラスミド (pGEM3IMA) に、BALB/cマウスのユビキチン遺伝子を組込んだ。ユビキチン遺伝子は、BALB/cマウスの脾臓細胞から抽出したゲノムDNAを鋳型にして、PCRによりクローン化したものである。ユビキチン遺伝子上流には発現量を高めるACC配列および開始コドン配列を配し、下流には遺伝子組込み用のポリリンカーを付加して、JEV遺伝子がユビキチンの下流に発現し融合蛋

白として発現されるように設計した。なお、ユビキチン単独でも発現できるように、ポリリンカーに含まれるXbaIサイトのTAA配列が停止コドンとして働くようにフレームを調整した。

JEV遺伝子組込みプラスミドの作製 : JEV中山株のC、NS2a、NS3遺伝子を、それらの遺伝子を含むクローン化cDNAを鋳型として、Taq DNAポリメラーゼ (Lifetech社製) を用いてPCRにより増幅した。PCRは、GeneAmp PCR System (Perkin Elmer社製) を用いて行った。増幅された遺伝子DNAの5'末端にはEcoRIサイトが、3'末端にはTAAの停止コドン及びXbaIサイトが含まれるようにプライマーを設計した。PCRにより増幅されたDNAを、EcoRI及びXbaI (New England Biolab社製) で処理、精製後、Rapid DNA Ligation Kit (Boehringer Mannheim社製) を用いて、pUBIQとライゲートした。DH5 Competent細胞 (Toyobo及びLifetech社製) のトランスフォーメーション後、プラスミドのスクリーニングを行い、C、NS2a、NS3を含むプラスミド (それぞれpUJEC、pUJENS2a、pUJENS3と称する) を得た。構築されたプラスミドにおける挿入遺伝子の塩基配列は、各プラスミドDNAをQuantum DNA精製キット (BioRad社製) 及びポリエチレングリコール沈殿により精製した後、パーソナルシーケンサー (アマシャムファルマシアバイオテク社製) を用いたシーケンシングにより確認した。その他の遺伝子操作は、標準法 (Current Protocols in Molecular Biology) に基いた。

E1遺伝子については、すでに作製しているpcJEE1 (E1を組込んだpcDNA3 : Konishi et al., *Journal of*

Virology 73, 5527-5534, 1999) から *EcoRI* 及び *XbaI* を用いて E1 を切り出して pUBIQ に組込むことにより作製した (pUJEE1 と称する)。E1 の塩基配列が正しいことは、pcJEE1 において確認している。

これらのプラスミド DNA は、マウス実験に使用するために、Qiagen Plasmid Purification Kit (Qiagen 社製) を用いて精製した。

ユビキチンの除去: ユビキチンの CTL 誘導促進効果を検討するために、pUJEE1 の対照として、pUJEE1 からユビキチン遺伝子を除去したプラスミド (pJEE1) を作製した。pUJEE1 におけるユビキチン遺伝子の両サイドに隣接して存在する *EcoRI* 及び *NheI* サイトを用いて酵素処理によりユビキチンを除去した後、酵素による切断部位を T4 DNA ポリメラーゼ (New England Biolab 社製) で伸長し、両端をライゲートした。ライゲーション近辺の塩基配列を調べて、目的の DNA が得られたことを確認した。

プラスミド DNA によるマウスの免疫: 精製 DNA をリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) に希釈して、6 週齢から 7 週齢の雄 BALB/c マウスに筋肉内接種した。左右の大腿四頭筋にそれぞれ 50ug、合計 100ug を 1 匹あたりに接種した。接種間隔を 2 週間以上として、1 回から 3 回免疫した。

JEV 高感受性 NIH-3T3 細胞クローン: BALB/c マウスと同系主要組織適合抗原を有する NIH-3T3 細胞は CTL 試験に用いる標的細胞として適するが、JEV に感染させた NIH-3T3 細胞の抗原発現率は 20% から 40% と低く、CTL 活性を感度高く検出することが困難であった。そこで、限界希釈によるクローニングを行い、JEV 感受性細

胞率を約 95% にまで高めた。このクローンを 3T3-3 細胞と称する。CTL 試験の 16 から 20 時間前に、3T3-3 細胞を JEV により 100:1 から 200:1 の高い m.o.i. で感染させ、標的細胞として用いた。対照としてモック感染 3T3-3 細胞も用意した。

CTL 試験: 最終免疫から 2 週間後、免疫マウスの脾臓を採取し、単細胞とした後、10% ウシ胎児血清 (Lifetech 社製) 及び 50uM β -メルカプトエタノールを含有する RPMI-1640 培養液 (Lifetech 社製) に浮遊した。この脾臓細胞を、1:8 希釈の JEV を含む上記 RPMI 培養液で 5 日間培養することにより刺激した。JEV として、C6/36 細胞に感染後 2-5 日目の培養液 (約 2×10^8 PFU/ml の JEV を含む) を用いた。対照として、脾臓細胞を非感染 C6/36 細胞培養液中で 5 日間培養した。これらの脾臓細胞は、1% ウシ血清アルブミン含有 RPMI-1640 培養液 (RPMI-BSA) で 6 回洗浄し、最終的に RPMI-BSA に 1×10^6 細胞/ml の濃度に浮遊した後、U 型 96 穴マイクロプレートにウエルあたり 100 μ l ずつ分注した。標的細胞である感染及びモック感染 3T3-3 細胞を RPMI-BSA で 6 回洗浄し、エフェクター: ターゲット (E:T) 比が 10:1 または 20:1 になるように浮遊液を作製し (1×10^5 または 5×10^4 細胞/ml)、その 100 μ l を脾臓細胞に混合した。反応は 37°C で 6 時間行い、反応終了 30 分前にピペッティングを行い、細胞を軽く攪拌した。傷害を受けた細胞から放出される乳酸デヒドロゲナーゼ量を Cytotoxicity Detection Kit (LDH) (Boenlinger Mannheim 社製) を用いて測定し、キットの説明書通り % specific lysis を求めた。反応には 1 実験区につき 5 ウエルもしくは 6 ウエルを用いた。

この方法は標準化されていない非アイトープ系のCTL試験であるので、条件設定のための予備試験を行い、脾臓細胞の刺激日数、E:T比や反応時間などにおいて最適条件下で行った。

免疫マウスへの攻撃：DNA3回免疫マウスに 5×10^5 から 1×10^6 LD₅₀のJEV P3株を腹腔内接種し、21日間観察した。

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。

C. 研究結果

ユビキチンの効果：CTLエピトープが存在するE1の遺伝子とユビキチン遺伝子を組んだpUJEE1及びE1遺伝子を含むがユビキチン遺伝子を含まないpJEE1を用い、ユビキチンのCTL誘導促進効果を調べた。各グループ2匹のBALB/cマウスを、pUJEE1、pJEE1またはpUBIQを1回または2回接種することにより免疫した。また、JEV感染マウスを陽性対照として用いた。これらのマウスの脾臓細胞を用いてCTL試験を行った結果を図1に示す。いずれのプラスミドにおいても1回免疫によってはCTL活性が検出できなかった。しかし、2回免疫後には、pUJEE1及びpJEE1接種マウスにおいて高い特異CTL活性が、特にE:T=20:1の条件で認められた。この結果から、E1におけるCTLエピトープの存在が確認された。この条件において、pUJEE1がpJEE1に比べてやや高いCTL活性を示した。この結果は、わずかではあるがユビキチンによりCTL誘導が促進されることを示す。

防御に及ぼすユビキチンの効果：致死量の攻撃からの防御に及ぼすユビキチンの効果を調べるために、

pUJEE1、pJEE1またはpUBIQによる3回免疫マウス2匹を 1×10^6 LD₅₀の、さらに2匹のマウスを 5×10^5 LD₅₀のJEV P3株で攻撃し、生存状況を観察した。pUBIQ免疫マウスはウイルス接種後14日までに全て死亡し、平均生存日数は、8.3日だった。pUJEE1は1匹のみ21日間生存し、平均生存日数は11.3日であり、pJEE1は2匹が観察期間生存し、平均生存日数は14.3日間であった。なお、攻撃前のマウス血清中には中和抗体が検出できないこと、また攻撃に対して生存したマウスの中和抗体は低く、中和抗体の関与する防御でないことを確認した。以上の結果により、用いたマウス頭数は少ないが、E1に存在するCTLエピトープは3回免疫により防御的に働くことが示唆された。しかし、防御に及ぼすユビキチンの促進効果は確認できなかった。

C、NS2a、NS3によるCTLの誘導：C、NS2a及びNS3におけるCTLエピトープの存在を調べるために、各グループ2匹のBALB/cマウスをpUBIQ、pUJEC、pUJENS2aまたはpUJENS3により2回または3回免疫し、CTLの誘導を調べた(図2)。その結果、DNAによる2回免疫マウスにはCTL活性は認められなかったが、3回免疫マウスにはいずれのJEV遺伝子を導入したグループにおいても高いCTL活性を認めた。これらの結果からCTLエピトープはC、NS2a、NS3のいずれにも存在することが明らかにされた。

C、NS2a、NS3の防御効果：C、NS2aまたはNS3により誘導されたCTLの防御効果を調べるために、各グループ2匹のBALB/cマウスをpUBIQ、pUJEC、pUJENS2aまたはpUJENS3により3回免疫した後に、致死量のJEVを接種し、21日間生存状況を観

察した。平均生存日数はpUBIQ接種群では16.5日、pUJEC接種群では10.5日、pUJENS2a接種群では8.5日、pUJENS3接種群では6.5日であり、pUBIQ免疫マウスの1匹は観察期間中生存した。この結果はC、NS2a、NS3により誘導されたCTLはマウスを防御せず、逆に生存日数の短縮を引き起こす事を示した。

D. 考察

pUJEE1とpJEE1を比較することにより、ユビキチンによるCTL誘導促進効果が2回免疫後にわずかに認められたが、防御におけるユビキチンの効果は確認できなかった。他のウイルスにおいてはCTL誘導及び防御共に増強効果が報告されているので、実験系の工夫により効果が明確に見られるかもしれない。

E1に存在するCTLエピトープは、攻撃後のマウスの平均生存日数を増加させた。このCTLエピトープは防御的に働くことを示唆する。また、pUJEC、pUJENS2aまたはpUJENS3による3回免疫マウスにもCTL活性が認められた。しかし、致死量の攻撃からの防御は認められなかった。むしろ生存日数は短くなり、C、NS2a、NS3のCTLエピトープは致死量の攻撃から防御する程のCTLを誘導しなかったと考えられる。誘導されたCTLは、1次増殖場所における感染細胞の破壊により生体防御を行なうと考えられるが、3回の免疫によってもウイルスの1次増殖を十分抑制するだけのCTLが誘導されなかったため、誘導されたCTLの2次増殖場所（脳）における細胞破壊の結果として、生存日数の短縮が起こったと思われる。サイトカインの投与などにより、CTL活性を増加させることで防御能力を

高める可能性がある。

本研究はC、NS2a、NS3を対象にCTLエピトープの検索を行なったが、防御をもたらす強いCTLエピトープは見出すことができなかった。しかし、JEV感染マウスに誘導されたCTLの移入によりマウスを致死量の攻撃から防御することが報告されており、他の遺伝子領域に防御CTLエピトープが存在すると考えられる。防御CTLエピトープの検索は、DNA免疫をベースとした日本脳炎CTLワクチンの開発に寄与する。

E. 結論

JEV中山株のC、NS2a及びNS3領域を対象にしてBALB/cマウスにおける防御CTLエピトープの検索を行ったが、この領域中に含まれるCTLエピトープは今回用いた実験系においては十分な防御を誘導しなかった。強い防御CTLエピトープは、他の領域に存在すると考えられる。

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* 73, 5527-5534 (1999).

Konishi E., Yamaoka M., Kurane I. and Mason P. W.: A DNA vaccine expressing dengue type 2 virus premembrane and envelope genes induces neutralizing antibody and memory B cells in mice. *Vaccine* 18, 1133-1139 (2000).

Takada K., Masaki H., Konishi E., Takahashi M., and Kurane I.: Definition of an epitope on Japanese encephalitis virus (JEV) envelope protein recognized by JEV-specific murine CD8+ cytotoxic T lymphocytes. Archives of Virology in press.

Konishi E., Yamaoka M., Kurane I. and Mason P. W.: Japanese encephalitis DNA vaccine candidates expressing premembrane and envelope genes induce virus-specific memory B cells and long-lasting antibodies in swine. Virology in press.

Konishi E., Kurane I. and Mason P. W.: Immune response to traditional and genetically engineered Japanese encephalitis vaccines. Recent Research Developments in Virology, Transworld Research Network, Trivandrum, India, in press.

Konishi E., Yamaoka M., Khin Sane Win, Takada K., Kurane I. and Mason P. W.: DNA vaccines for dengue and Japanese encephalitis. International Seminar on Dengue Fever/Dengue Haemorrhagic Fever. Surabaya, Indonesia (1999) .

小西英二、山岡政興、倉根一郎：日本脳炎 DNA ワクチンのブタにおける抗体誘導能。第 47 回日本ウイルス学会学術集会・総会（1999）。

藤井敦子、鳥谷朋美、小西英二：日本脳炎ウイルス細胞外粒子を産生する細胞クローンの樹立。第 47 回日本ウイルス学会学術集会・総会（1999）。

Konishi, E.: Development of DNA vaccines for Japanese encephalitis and dengue. Frontiers of RNA virus research II, Kyoto, Japan (2000) .

2. 学会発表

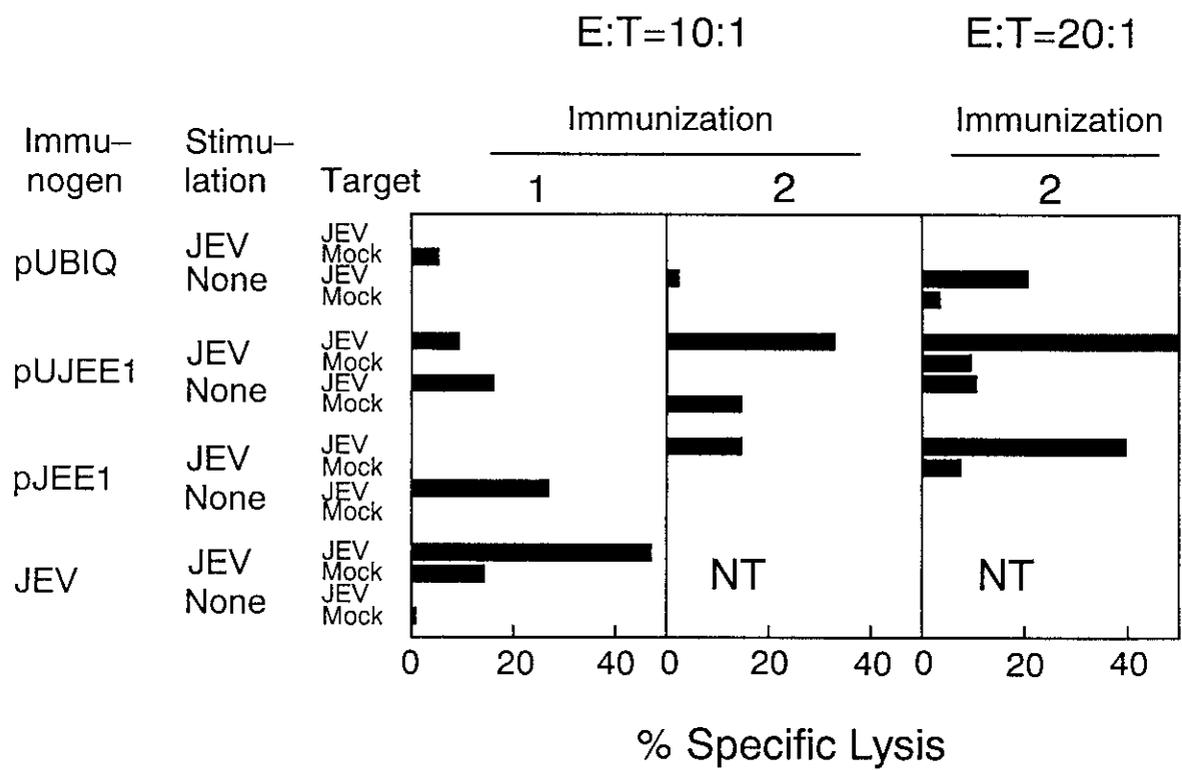


図1. マウスユビキチンのCTL誘導促進効果。
NTはCTL試験を行っていないことを示す。

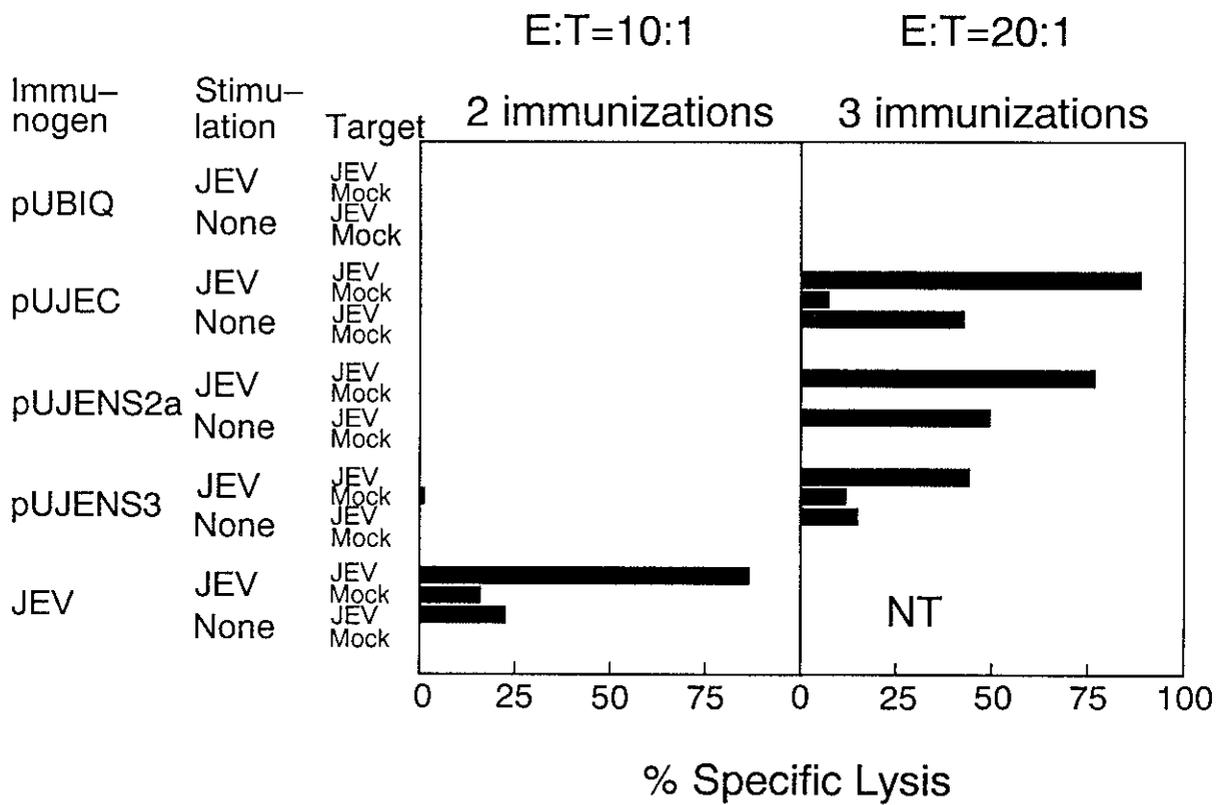


図2 日本脳炎ウイルスC、NS2a、NS3が誘導するCTL活性。
NTはCTL試験を行なっていないことを示す。

分担研究報告書

デング DNA ワクチンの開発：NS3 遺伝子組込み DNA ワクチンの マウスにおける免疫原性

分担研究者 山岡政興(兵庫県立衛生研究所)
共同研究者 小西英二(神戸大学医学部医療基礎学講座)
高崎智彦(国立感染症研究所)
倉根一郎(国立感染症研究所)
R. Padmanabhan(カンサス大学医学部)

研究要旨 デング DNA ワクチンの候補としてサイトメガロウイルスの強カプロモーターやウシ成長ホルモン由来のポリ A 配列付加シグナルを含む市販の pcDNA3 ベクターに、デング (DEN) ウイルス 2 型ニューギニア C 株の非構造タンパク NS3 遺伝子約 1850bp を組み込んだ pcD2NS3 を作製し、マウスを用いて免疫誘導能と防御効果について予備的に検討した。5 週令の雌 Balb/c マウスを使用し pcD2NS3 の 100ug/回を 2 週間間隔で 3 回筋注接種して免疫した。初回接種から 4 週間後、血清中に NS3 に対する抗体の誘導を確認できた。しかしながら、3 回免疫後 2 週間目のマウスをデングウイルス 2 型トリニダット TR1751 株で攻撃し、生死および病気の進行状況で防御免疫を検討したところ、明確な防御効果を見ることはできなかった。

A. 研究目的

病原体の遺伝子そのものを宿主内で発現させることにより防御免疫を誘導する DNA ワクチンは、動物モデルにおいて多くの病原体に対して有効であることが報告されてきており、新しいワクチン開発手法として注目されている。我々はこれまでに日本脳炎ウイルス (JEV) 遺伝子産物の防御免疫誘導能をマウスモデルを用い

て解析してきた。prM のシグナル配列、prM および E 遺伝子からなる遺伝子カセットは、導入した細胞に JEV の prM/E を粒子の形で発現させ、マウスに高い防御免疫を誘導することを報告した。同様の作戦でデングウイルス 2 型ニューギニア C 株 (NGC) の prM/E 遺伝子をプラスミドに組み込んだ pcD2ME をデング DNA ワクチンの候補として作製し、防御免疫誘