

導能をマウスモデルを用いて解析した。その結果、pcD2ME はマウスに中和抗体および記憶 B 細胞を誘導することが示された。しかし、pcD2ME によるデングウイルス特異的キラー T 細胞の誘導は明確には示されなかった。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 NS3 タンパクが E タンパクよりも T 細胞に認識されやすいと報告されている。本研究は、デングウイルスの NS3 遺伝子組み込みプラスミド（平成 10 年度研究班分担研究報告書「デングウイルス非構造タンパク NS3 遺伝子組み込み DNA ワクチンの作製」）をマウスに免疫し、NS3 遺伝子の免疫原性と共に、マウスにおける防御免疫の誘導を調べることを目的とした。

B. 研究方法

プラスミド：PCR による NS3 遺伝子 DNA の増幅のために、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 (Padmanabhan et al., 1989) 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 (Invitrogen) の Eco RV/Xba I サイトに挿入してプラスミド pcD2NS3 を作製した。作製法の詳細は昨年度の研究班分担研究報告書「デングウ

イルス非構造タンパク NS3 遺伝子組み込み DNA ワクチンの作製」に詳述した。

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。

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 μ g 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、 3×10^6 PFU/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。1 回目の接種（5 週令）後、2 週目（7 週令）、4 週目（9 週令）と 6 週目（11 週令）に眼窩静脈叢より採血し、血清を分離した。接種後 2 週目と 4 週目の血清はグループごとプールした後、試験に用いた。

NS3 に対する免疫誘導：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、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。持続発現細胞は、プロフェクタアミン (Gibco) を用いて L929 細胞に pcD2NS3 をトランスフェクト後、選択培養をくり返すことによって得られた。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。

C. 研究結果

血清中の NS3 に対する免疫の誘導：100 ug 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(表1)。初回接種から2週目(7週令)および4週目の3回目の接種に先立って採血した9週令のそれぞれのグループのプール血清中の抗 NS3 抗体を調べた。

Balb/c マウスに100 ug の pcD2NS3 により3回免疫した。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、100 ug の pcDNA3 ベクターにより免疫したマウスには抗 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。PBS 接種グループは、全く反応しなかった。

免疫後のマウス防御効果：5週令の Balb/c マウスに100 ug 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、攻撃後

14日までマウスの生死と、病気の動態を観察した(表2)。その結果、pcD2NS3 により3回免疫したマウスは攻撃後、14日までですべて死亡した。これに対して対照として、pcDNA3 ベクターを接種したマウス、および免疫原を接種しなかった PBS 接種マウスは、攻撃後12日までですべて死亡した。一方、 3×10^6 PFU の NGC 株で免疫したマウスにおいては、攻撃後14日まで生残したマウスは1匹にとどまり、後の3匹は14日まで死亡した。

D. 考察

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 NS3 タンパクが E タンパクよりも T 細胞に認識されると報告されている。今回マウスのデングウイルス2型 NS3 遺伝子組込みプラスミド pcD2NS3 のキラー T 細胞の誘導を調べる前段階として、マウス生体内における NS3 免疫の誘導と、マウスにおける防御免疫が誘導されるか否かを予備的に検討した。その結果、pcD2NS3 接種後4週目に20倍の抗デング NS3 抗体が検出され、プラスミドがマウス体内で発現したことが示された。しかしながら、pcD2NS3 を3回接種して2週後(初回免疫から6週間目)に攻撃した結果、明確な防御効果は示されなかった。今回のマウス実験においては、デングウイルス2型 NGC 株で免疫したマウスグループにおいて、14日まで4匹中3匹が死亡している。防御効果をみるためには、攻撃ルートを含め、実験系を検討する必要がある。

ある。

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我々の一連の研究（平成 9 年度分担研究報告書「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」）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、同じ作戦で 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（平成 10 年度分担研究報告書「デング DNA ワクチンの開発：マウスにおける防御免疫誘導」）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。しかしながら、デングウイルス感染においては NS3 タンパクが E タンパクよりも 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。今後は作製したプラスミドを用いたデングウイルス特異的キラー T 細胞の誘導に関する解析を急ぐ必要がある。

E. 結論

pcDNA3 をベクターとし、デングウイルスの非構造タンパク NS3 遺伝子約 1850bp を組み込んだプラスミド pcD2NS3 はマウスにおいて免疫原性を示した。しかしながら、マウスに防御免疫を誘導できるか否かについて

は明確なデータは得られなかった。

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.: The Anamnestic Neutralizing Antibody Response is Critical for Protection of Mice from Challenge Following Vaccination with a Plasmid Encoding the Japanese Encephalitis Virus Premembrane and Envelope Genes. *Journal of Virology* 73, 5527-5534 (1999).

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., 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).

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）。

表 1 pcD2NS3 の 3 回免疫による抗 Dengue ウイルス NS3 免疫の誘導^a

免疫原	投与経路	投与量 ^c	抗 Dengue NS3 抗体価 ^b		
			2 週目 ^d	4 週目	6 週目
pcD2NS3	筋肉内	100 ug	<10	20	NT
pcDNA3	筋肉内	100 ug	<10	<10	NT
DEN2 NGC ^e	筋肉内	3x10 ⁶ PFU	<10	80	NT
PBS	筋肉内	-	<10	<10	NT

^a各免疫原をグループあたり 5 匹の 5 週令雌 Balb/c マウスに 2 週間隔で 3 回接種した。2 回目あるいは 3 回目接種の前に採血し、プール血清の抗 NS3 抗体を測定した。

^bNS3 持続発現 L929 細胞を用いた蛍光抗体法

^c投与量/回/マウス

^d初回免疫後の週数

^eDengue ウイルス 2 型ニューギニア C 株

表 2 pcD2NS3 を接種されたマウスにおける防御免疫の誘導

免疫原	攻撃後の日数											
		1	2	3	4	5	7	8	10	11	12	14
pcD2NS3	#1	OK	OK	OK	OK	OK	OK	S	S	P	P	D
	#2	OK	OK	OK	OK	OK	OK	S	S	P	D	
	#3	OK	OK	OK	OK	OK	OK	S	P	D		
	#4	OK	OK	OK	OK	OK	S	D				
	#5	OK	OK	OK	OK	OK	D					
pcDNA3	#1	OK	OK	OK	OK	OK	OK	S	P	P	D	
	#2	OK	OK	OK	OK	OK	S	S	P	D		
	#3	OK	OK	OK	OK	OK	S	S	D			
	#4	OK	OK	OK	OK	OK	D					
	#5	OK	OK	OK	OK	OK	D					
DEN2 NGC	#1	OK	OK	OK	OK	OK	OK	OK	OK	OK	OK	OK
	#2	OK	OK	OK	OK	OK	OK	OK	OK	OK	S	D
	#3	OK	OK	OK	OK	OK	OK	OK	OK	OK	S	D
	#4	OK	OK	OK	OK	OK	D					
	#5											
PBS	#1	OK	OK	OK	OK	OK	S	S	P	P	D	
	#2	OK	OK	OK	OK	OK	S	S	P	D		
	#3	OK	OK	OK	OK	OK	S	S	P	D		
	#4	OK	OK	OK	OK	OK	S	S	D			
	#5	OK	OK	OK	OK	OK	S	D				

S : Sick、毛が逆立っている

P : Palsy、動かない

D : Dead、死亡

分担研究報告書

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

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)
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 NS5 遺伝子約 2700bp を組み込んだ pcD2NS5 を作製した。ワクチンとしての効力を高めるために、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。さらに一度に増幅するには長過ぎるために約 2700bp をそれぞれがほぼ等分になるように 3 分割し、順番に pcDNA3 ベクターに組込んだ。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は、シークエンシングによって確認した。

A. 研究目的

最近、新しいワクチン開発法として、目標とするウイルス遺伝子を生体内で発現させることにより、防御免疫を誘導する DNA ワクチンが注目されている。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、防御免疫誘導能をマウスモデルを用いて解析した。その結果、pcD2ME はマウスに中和抗体および記憶 B 細胞を誘導することが示された。しかし、pcD2ME によるデングウイルス特異的キラー T 細胞の誘導は明確には示されなかった。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 あるいは NS5 タンパクが E タンパクよりも T 細胞に認識されると報告されている。本研究は、すでに行っている NS3 の実験（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」と同様、デングウイルスに対する特異的キラー T 細胞の誘導および防御効果を調べるために、デングウイルスの NS5 遺伝子組込みプラスミドを作製することを目的とした。

B. 研究方法

PCR による NS5 遺伝子 DNA の増幅のために、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 (Padmanabhan et al., 1989) 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。すべての遺伝子操作は標準法 (Maniatis et al., 1982) に基づいた。作製したプラスミドは、コンピテント細胞に大腸菌 DH5 (東洋紡) 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。プラスミド DNA は、Qiagen を用いて精製し、1% アガロースゲル電気泳動および分光光度計を用いた吸光度測定により定量した。DNA ポリメラーゼには Takara Ex Taq (宝酒造) を用い、制限酵素は Hind III、Bam HI、Xba I および Apa I (Gibco

BRL) を使用した。また、PCR には宝酒造のサーマルサイクラー TP480 を用い、DNA の定量は吸光度測定により、島津製作所の島津自記分光光度計 UV-2200A を用いた。シークエンシングには ABI 社の ABI PRISM™ 310 Genetic Analyzer を用いた。

C. 研究結果

読み間違いを避ける工夫：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 遺伝子は、約 2700bp と長いために DNA ポリメラーゼに修復機能のある Takara Ex Taq (宝酒造) を用い 15 サイクルで PCR を行ってもなお読み間違いの可能性が考えられた。そこで、約 2700bp をそれぞれ約 1000bp 以下になるように 3 分割して PCR で遺伝子を増幅し、1/3、2/3 そして 3/3 と順にベクター pcDNA3 に組込む作戦をとった。pcDNA3 の T7 プロモーターの下流にあるマルチクロニングサイト、11 サイトのうちニューギニア c 株の NS5 遺伝子上に存在しない Hind III、Bam HI、Xba I、Apa I サイトを見出し、さらに NS5 遺伝子をほぼ 3 等分できるサイトを遺伝子解析ソフト GENETYX (ソフトウェア開発株式会社) を使用して見出した (図 1)。NS5 遺伝子の 1/3 はプライマー YD1 と YD2、2/3 は YD3 と YD4、そして 3/3 は YD5 と YD6 (図 1) を使用した PCR で増幅した。それぞれのプライマーには以下に示す切出し用の制限酵素サイトを入れて作製した。すなわち YD1 には Hind III、YD2 と YD3 には Bam HI、YD4 と YD5 には Xba I そして YD6 には Apa I サイトを入れて作製した (図 1)。

発現量を高める工夫：まず pcDNA3

の T7 プロモーターの下流にあるマルチクローニングサイトの Hind III サイトにデングウイルスの NS5 遺伝子約 2700bp の最初の 1/3 を組み込むために、PCR で 2 種類のプライマーを用いて NS5 遺伝子の増幅を試みた (図 1)。センスプライマー (YD1) は、NS5 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 Hind III を付加して作製した。また、アンチセンスプライマー (YD2) は、NS5 コード領域の 3' 末端に切り出し用に Bam HI 配列を入れて作製した。一方、NS5 の最後の 3/3 のアンチセンスプライマー (YD6) は、NS5 コード領域の 3' 末端に停止コドンと切り出し用に Apa I 配列を入れて作製した。pcDNA3 には上述のとおりサイトメガロウイルスの強力プロモーターやポリ A 配列付加シグナルが装備され、発現量を高めているが、今回我々は、開始コドン周辺の塩基配列が発現量に影響するという Kozak の報告 (1986) に基づき、ACC 配列を ATG のすぐ上流に置いて、発現量を高める工夫をした。また、NS5 領域約 2700 bp の 3 等分をそれぞれ PCR で読み間違いをしないで正確に増幅するために、増幅サイクルを 15 回と常法より少なくし、DNA ポリメラーゼに 3'→5' エキソヌクレアーゼ活性を含む耐熱性 DNA ポリメラーゼである Takara Ex Taq を選んだ。

作製されたプラスミドの検定：作製されたプラスミド pcD2NS5 のデングウイルス遺伝子部分、ACC 配列および開始、停止コドンがデザインどおり正しく組み込まれていることは、ABI 社の BigDye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit を

用いて反応させ、オートシーケンサー ABI PRISM 310 を用いたシーケンシングにより確認した。

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我々の一連の研究 (平成 9 年度分担研究報告書「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」) 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、同じ作戦で 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 (平成 10 年度分担研究報告書「デング DNA ワクチンの開発：マウスにおける防御免疫誘導」) 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。しかしながら、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 あるいは NS5 タンパクがデングウイルス E タンパクよりも 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。平成 11 年度の分担研究「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」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。しかしながら、予備的ではあるが、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 Dengue 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か否か解析する予定である。

E. 結論

pcDNA5 をベクターとし、発現量を高める工夫を加えて Dengue ウイルスの非構造タンパク NS5 遺伝子約 2700bp を組み込んだ Dengue DNA ワクチン pcD2NS5 を作製した。

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.: The Anamnestic Neutralizing Antibody Response is Critical for Protection of Mice from Challenge Following Vaccination with a Plasmid Encoding the Japanese Encephalitis Virus Premembrane and Envelope Genes. *Journal of Virology*

73, 5527-5534 (1999).

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., 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).

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)。

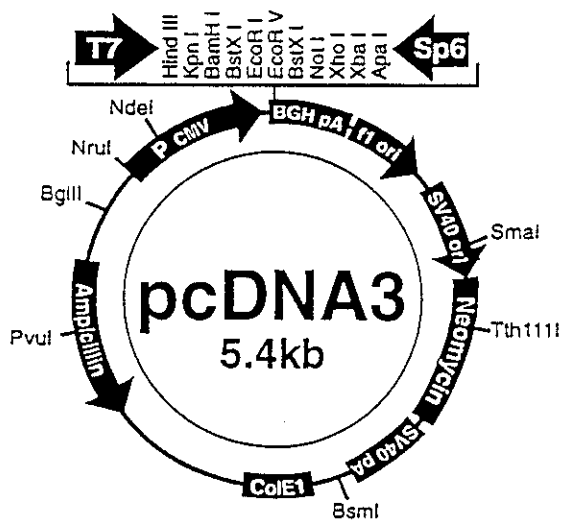
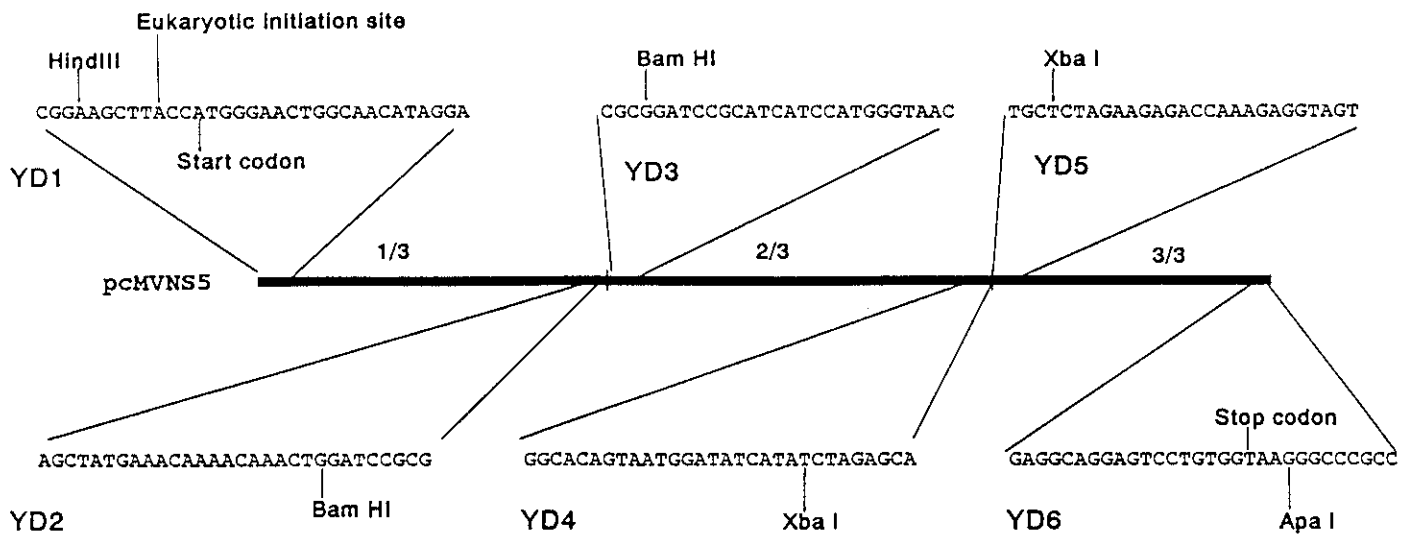


图 1. pcD2NS5 作製法

分担研究報告書

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

分担研究者 小西英二（神戸大学医学部医療基礎学講座）

研究要旨 日本脳炎ウイルス（JEV）非構造蛋白NS1に対する抗体を免疫染色法により測定する系を開発するために、抗原となるNS1を発現する細胞クローンを樹立した。NS1遺伝子を導入するためのプラスミドは、NS1上流のシグナル配列の長さを15アミノ酸または20アミノ酸の2種、また下流にNS2a遺伝子を付加したものと付加しないものの2種で、合計4種を作製してCHO-K1細胞にトランスフェクトした。発現量や細胞の状態を観察した結果、20アミノ酸から成るシグナル配列を有し、NS2aを付加しないプラスミドが、細胞株樹立のために最も適することが判った。このプラスミドをトランスフェクトしたCHO-K1細胞をジェネティシン（G418）により選択し、さらに限界希釈法によりクローニングして、80%から90%の細胞がNS1を発現する細胞クローンを得た。少なくとも10回の継代を経てもこのクローンのNS1発現率は低下しなかった。このNS1発現細胞クローンは、JEV感染状況の疫学調査や新しい日本脳炎ワクチンの効力評価において、NS1抗体測定系の抗原として有用であると考えられる。

A. 研究目的

日本脳炎ウイルス（JEV）は、ブタを増幅動物とする蚊媒介性フラビウイルスであり、東南アジアを中心に流行している。我が国における年間日本脳炎患者発生数は近年10人以下の状態であるが、特に西日本においてはブタのJEV抗体保有率が高いことから、自然界において依然としてJEVの伝播サイクルは回りつづけており、ヒトもJEVの曝露を受けていることが考えられる。日本ではほとんどのヒトが15歳までに日本脳炎ワクチン接種を受けているが、防御

に重要とされる中和抗体を維持するために追加接種を受けている成人は高年齢者を除き稀である。従って日本のワクチン被接種者を対象としたJEV感染状況の疫学調査は、不顕性感染率やワクチンの防御機序を知る上で極めて重要である。

ワクチン被接種者におけるJEV感染の証明は、血清中の非構造蛋白に対する抗体の検出により可能となる。すなわち、現行の日本脳炎ワクチンは精製ウイルスをホルマリンで不活化して製造されるので、このワクチンにはウイルス構造蛋白質のみが含

まれており、ワクチンに含まれていない非構造蛋白に対する抗体の存在は感染の証拠となる。従って、非構造蛋白に対する抗体を指標として、感染状況の疫学調査が可能となる。

フラビウウイルスのゲノムはプラス極性の単鎖RNAであり、約10kbの一続きの長い読み取り枠（ORF）が存在する。ORFは約3000アミノ酸からなるポリ蛋白質に翻訳され、3種類の構造蛋白と少なくとも7種類の非構造蛋白に切断される。これらの非構造蛋白の中で、感染の指標として最も適切な蛋白はNS1であると考えられる。NS1はかつて可溶性補体結合抗原と呼ばれた糖蛋白質で、フラビウウイルス感染細胞から放出され、宿主はNS1に対する抗体産生が比較的効率よく誘導される。NS1に対するモノクローナル抗体の移入によりマウスが致死量の攻撃から防御されるため、NS1抗体はフラビウウイルス感染症に対する防御因子の1つと考えられている。これらの理由により本研究ではNS1抗体に注目した。

フラビウウイルス感染細胞において、NS1は外被膜（E）蛋白C末端に存在するシグナル配列に導かれ小胞体内腔に移行し、シグナラーゼによりEとNS1に分割される。NS1の生物活性を示す成熟型は2量体として存在する。また、NS1遺伝子の下流には順にNS2a、NS2b、NS3などがコードされる。NS2a、NS2bはいずれも疎水性の蛋白質でポリ蛋白質の切断を調節する機能を持つと考えられている。NS1とNS2aの切断にはNS2aが関与すると考えられ、NS2aが作用するためにはあらかじめNS3のN末端約1/3の作用によりNS2aとNS2bとの間及びNS2bとNS3との間が切断されている必要がある。

従来抗NS1測定には免疫沈降反応が用いられてきたが、この方法はラジオアイソトープを使用するため、多数の検体を扱うには適さない。またJEV感染培養液からNS1を抽出する生化学的手法には危険性などの点で制限がある上、精製過程での抗原性の失活も考えられる。抗NS1を感作した固相をJEV感染細胞培養液と反応させてNS1蛋白を吸着させた後、このNS1を抗原として用いるcapture ELISAの系は理論的であるが、実際的には陽性検体と陰性検体を区別しにくい面があった。そこで、NS1を連続的に発現する細胞株を樹立し、それを抗原とした免疫染色法が、NS1抗体を測定する最適な方法と考えた。

本研究の目的は、NS1遺伝子組込みプラスミドを作製し、NS1抗原連続発現細胞株を樹立することである。なお、この細胞株を用いてNS1抗体を測定する方法については、今年度の同研究班分担研究報告書『日本脳炎ウイルス非構造蛋白NS1抗体測定系の確立』に詳述した。

B. 研究方法

プライマー：NS1の発現量は、上流に存在するシグナル配列の長さや下流のNS2aの存在に依存すると考えられるので、これらの因子が異なる4種の遺伝子が増幅されるようプライマーを設計した。すなわち、シグナル配列に関しては15アミノ酸または20アミノ酸から成るように、またNS2aに関してはNS1の下流に付加するものと付加しないものである。pcDNA3ベクターのマルチクローニングサイトの中で、NS1及びNS2aの組込みにはEcoRI/XbaIサイトを利用することが妥当であると考えられたの

で、センスプライマーとアンチセンスプライマーに各々EcoRIサイト、XbaIサイトを付加した。また、センスプライマーには発現量を高めるACC配列と開始コドンのATG配列、そしてアンチセンスプライマーには停止コドンのTAA配列を付加した。

プラスミドの構築：JEVの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 (Invitrogen社製) に組み込み、4種のプラスミドを構築した(図1)。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(Lefetech社製)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。トランスフェクトされた細胞の選別のために、pcDNA3はネオマイシン耐性遺伝子を搭載している。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シーケンシングにより確認した。

トランスフェクション：NS1遺伝子の細胞への導入は、Transfectam (Biosepra社製)を用いて上記プラスミドをCHO-K1細胞にトランスフェクトすることにより行った。

発現細胞の選別：ネオマイシンの構造類似物質であるジェネティシン(G418: Gibco BRL社製)を、最終濃度400ugとなるように細胞培養液に添加して、細胞選別に用いた。また、

クローニングは限界希釈法により行った。

免疫染色：トランスフェクトした細胞を24時間培養後、アセトン・メタノール(1:1)で固定しABCおよびVIPキット(Vector社製)を用いて免疫染色を行った。1次抗体としてJEVに対するポリクローナル抗体(HMAF)、NS1に対するモノクローナル抗体(7E11)及びEに対するモノクローナル抗体(11B9)を用いた。また細胞選別後の発現率を調べるために、全細胞数に対する染色細胞数の割合を求めた。

C. 研究結果

4種のプラスミドの比較：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。pJEss15NS1をトランスフェクトしたCHO細胞は丸く変形した。従って、細胞株樹立に用いるプラスミドとしてpJEss20NS1が最も適当と考えた。

G418による細胞の選別：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(期間にして約1ヶ月間)後においても発現率が20%にとどまった(図2)。

クローニングによる細胞の選別：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(図2)。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。発現率の急激な上昇は、G418存在下におけるクロー

ニングが、発現細胞の選別に効果的であったことを示す。しかし、この細胞クローンはさらにクローニングを2回重ねても100%の発現率には至らなかった。興味あることに、3回のクローニングにより得られた80～90%の発現率は、少なくとも10代の継代によって低下することはなかった。従って、このクローンは全細胞が発現しているわけではないが、JEV感染の疫学調査に使用しうる安定なクローンと考えられる。このクローンの免疫染色像を図3に示す。HMAF及び7E11抗体により染色されたが、11B9抗体及びPBSによっては染色されなかった。

D. 考察

フラビウイルス蛋白の割断は翻訳とほぼ同時に起こるものが多いが、NS1とNS2aの間は比較的遅くに割断される。JEV感染細胞において、NS1とNS2aとが割断されていないNS1-NS2a及び割断されたNS1が、それぞれ2量体として細胞表面に現われ、抗体依存性補体介在性細胞傷害による防御を誘導すると言われている。ウイルス本来のNS1生合成に近似させるためにNS1遺伝子のみを含むプラスミドの他、NS1-NS2a遺伝子を含むプラスミドも作製しNS1の発現を比較した。NS1はNS1-NS2aよりも細胞表面に発現されやすいとされるが、今回 pJEss15NS1-NS2a 及び pJEss20NS1-NS2aをトランスフェクトした細胞にNS1の発現は全く検出できなかった。免疫染色用の抗原は細胞に多く含まれることが必要であり、今回NS2a遺伝子を付加しないプラスミドを用いた。

NS1発現細胞をG418により選別する過程において、発現率は期待通り

には上昇しなかった。プラスミドが導入された細胞はG418耐性を獲得するので、G418選択により理論上は100%の発現率が得られるはずである。しかし、本研究においては10回の継代を経ても発現率は20%と低かった。G418耐性遺伝子のみが発現されNS1遺伝子が発現しない細胞が多かったと思われる。一方、細胞のクローニングにより発現率は急激に上昇した。

ネオマイシン耐性遺伝子を含むプラスミドをトランスフェクトした細胞のG418による選別は、一般的な手法である。しかし、発現蛋白が細胞の生育に有利な場合、また影響のない場合には成功しやすいが、生育に不利に働く場合にはその限りではない。ネオマイシンにより細胞が受けるストレスとウイルス蛋白の毒性が相乗的に作用し、発現細胞が死滅するか、生育が悪くなり非発現細胞に淘汰されるものと考えられる。今回の研究では、NS1蛋白が細胞に対してある程度毒性に働いたものと思われる。特に、pJEss20NS1をトランスフェクトしたCHO細胞は正常の形態で生育を続けたのに対してpJEss15NS1をトランスフェクトしたCHO細胞は丸く変形した。詳細に検討していないが、ウイルス蛋白の発現が細胞にアポトーシスを誘導する可能性が示唆された。

新しいワクチン開発における最近の有力な手段の1つに、ウイルス遺伝子の一部を宿主の体内で発現させることにより防御免疫を誘導する方法がある。この方法は、ウイルスに存在する全長の遺伝子を用いないので、不要なウイルス抗原に対する免疫応答を誘導しないし、また安全性も高い。我々は、日本脳炎やデングに対するDNAワクチンとして、prM及びE

遺伝子を組込んだプラスミドを作製、評価してきた。日本脳炎DNAワクチンは、マウスに中和抗体及び防御免疫を（一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』参照）、また増幅動物であるブタに中和抗体を誘導した（昨年度の同研究班分担研究報告書『ブタにおける日本脳炎DNAワクチンの免疫誘導能』参照）。デングDNAワクチンは、マウスに中和抗体を誘導した（昨年度の同研究班分担研究報告書『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』参照）。これらのワクチンが実験動物やヒトにおいて感染を防御するかどうかを調べるために、また感染レベルの推移を調べるためにNS1抗体は1つの指標となる。従って、本研究において樹立されたNS1発現細胞を用いたNS1抗体測定法は、新たに開発されたワクチンの効力評定に、また防御機構解明に有用であると考えられる。

E. 結論

JEVのNS1遺伝子を導入したCHO-K1細胞をクローニングすることによりNS1蛋白を発現する細胞クローンを樹立した。このクローンは、新型ワクチン開発に必要なNS1抗体測定系において、免疫染色法の抗原として有用と考えられる。

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.

2. 学会発表

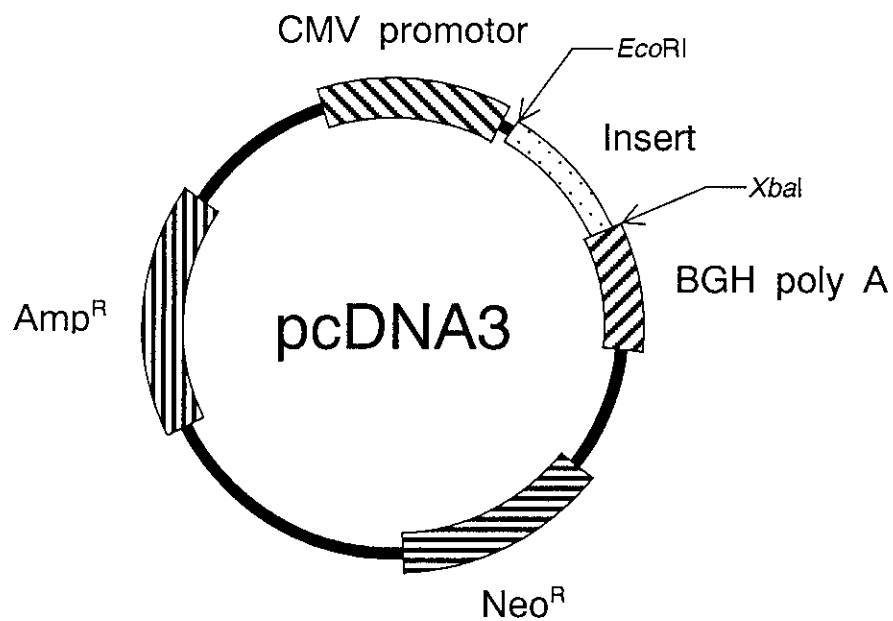
Konishi E., Yamaoka M., Khin Sane Win, Takada K., Kurane I. and Mason P. W.: DNA vaccines for dengue and Japanese encephalitis. *International Seminar on Dengue Fever/Dengue Haemorrhagic Fever*. Surabaya, Indonesia (1999) .

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) .



Insert	Construct
15aa signal + NS1	pJEss15NS1
20aa signal + NS1	pJEss20NS1
15aa signal + NS1+NS2a	pJEss15NS1-NS2a
20aa signal + NS1+NS2a	pJEss20NS1-NS2a

図1. NS1遺伝子組込みプラスミドの構築。

G418 selection

10 passages
5% →→→→→→→→→→→20%

G418 selection+cloning

~20% → 70-80% → 70-80% → 80-90%

図2. NS1抗原発現細胞クローンの樹立過程。

→は1回の継代、%はNS1抗原発現率を示す。

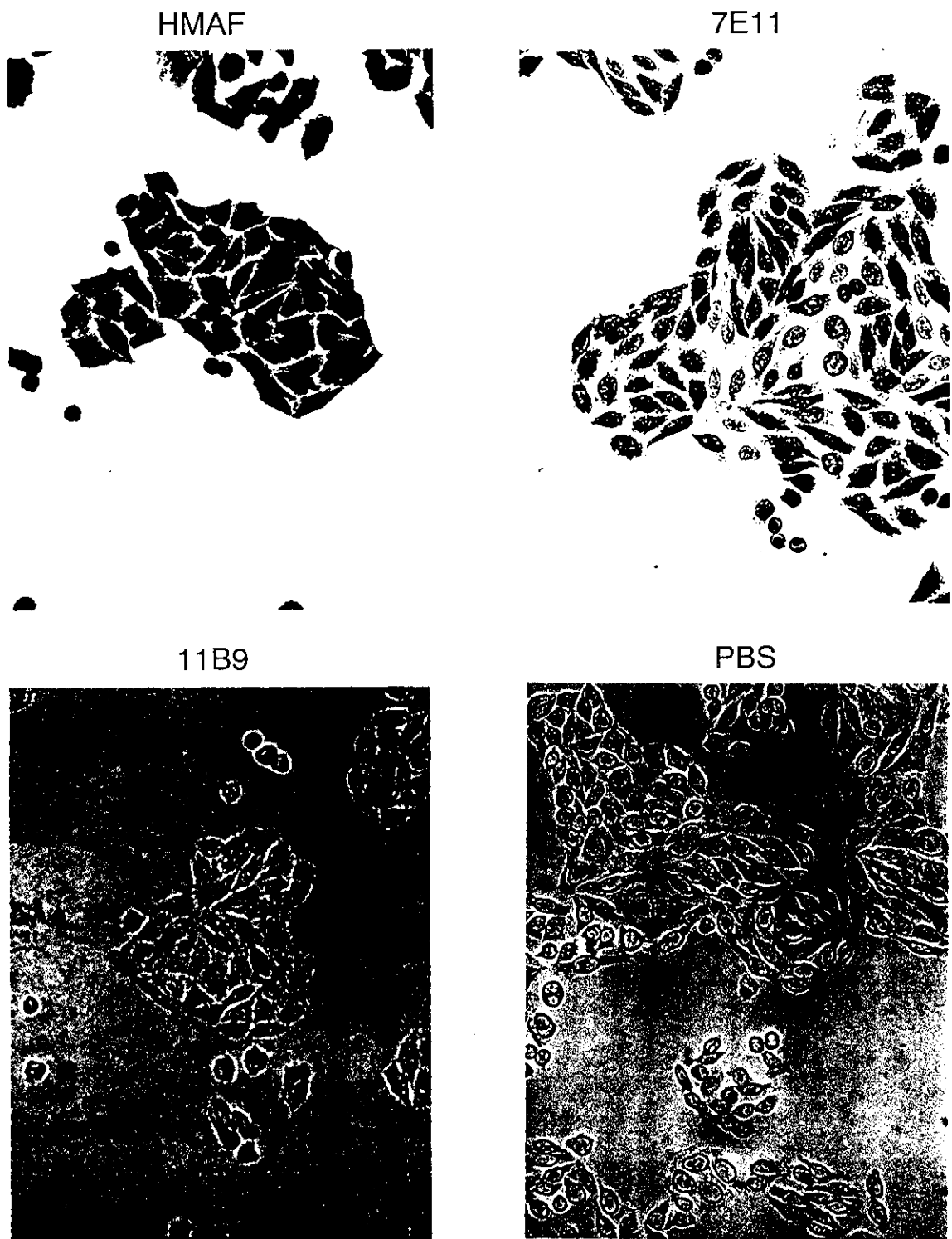


図3. NS1抗原発現細胞クローンの免疫染色像。
1次抗体として、JEV特異ポリクローナル抗体（HMAF）、NS1特異
モノクローナル抗体（7E11）及びE特異モノクローナル
抗体（11B9）、また対照としてPBSを用いた。