

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

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 現行の日本脳炎不活化ワクチンは高い効力を有するが、防御に重要な中和抗体を維持するには3年毎の追加接種が必要とされる。しかし日本脳炎ウイルス（JEV）が自然界で活動を続けている日本において、高齢者を除き追加接種を受けている成人は稀であるにもかかわらず、患者数は年に10人以下と少ない。本研究では、JEV不顕性感染率を推定するため、非構造蛋白NS1に対する抗体測定系を確立した。不活化ワクチンにはウイルス構造蛋白しか含まれないため、NS1抗体の存在はJEV感染を意味する。この測定系は、NS1抗原連続発現細胞株を抗原とした免疫染色により血清中の抗体価を終点法で求めることを原理とする。アビジン・ビオチン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。

A. 研究目的

日本脳炎ウイルス（JEV）はフラビウイルス科フラビウイルス属に分類され、東南アジア地域を中心に広く分布している。JEVは自然界において、増幅動物のブタと媒介蚊（主にコガタイエカ）の間でJEVの伝播サイクルが成立し、ヒトの感染は蚊により伝播される。ウイルスを保有する蚊に刺咬されたヒトの大多数は不顕性感染にとどまるが、数百人に1人が高熱、頭痛、意識障害などの急性脳炎症状を呈する。発症患者の約20%が死亡し、生存者の約半数も精神神経障害を伴う後遺症を残す。

予防法としては媒介蚊駆除、ブタへのワクチン接種、ヒトへのワクチン接種などが挙げられる。現行の最有力予防手段はヒトを対象とした広範囲の不活化ワクチンの投与である。不活化ワクチンの3回免疫によりヒトに中和抗体を誘導した後、2~3年毎に追加接種を行うことにより免疫を持続させる。すなわち、このワクチンの防御機構は中和抗体の存在により、感染蚊の刺咬後ヒトの体内に侵入したウイルスを細胞に感染するまでに不活化し、子孫ウイルスを作らせない、いわゆるsterile immunityの誘導と考えられてきた。しかし日

本においては、高年齢者を除いて実際に追加接種を受ける成人は少なく、抗体持続期間は約3年とされるので中和抗体陰性者は多いと考えられる。従って、大多数のヒトがワクチンを接種している日本人においてどれくらいの感染率があるのかを調べることは、不活化ワクチンの防御機構を明らかにする上で重要である。

JEVの構造蛋白はコア蛋白(C)、外被膜糖蛋白(E)、膜蛋白(M)の3種類である。ゲノムRNAは約11kbの塩基から成る1本鎖プラス極性RNAで、上記の構造蛋白遺伝子の他、非構造蛋白遺伝子(NS1、NS2a、NS2b、NS3、NS4a、NS4b、NS5)をコードする。不活化ワクチンは精製ウイルス粒子を成分とするため構造蛋白しか含まず、不活化ワクチン被接種者には構造蛋白に対する抗体しか産生されない。一方、JEV感染者には非構造蛋白に対する抗体も産生されるため、非構造蛋白に対する抗体を検出することにより感染を証明することができる。

本研究では、JEVのNS1発現細胞を抗原にした免疫染色によるNS1抗体測定系を確立した。なお、NS1発現細胞に関しては、同研究班の分担研究報告書『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』に詳述した。

B. 研究方法

抗原の作製：クローン化したNS1連続発現CHO-K1細胞と、NS1非発現CHO-K1細胞を各々 8.5×10^4 細胞ずつ96穴マイクロプレートに入れ(ウエルあたり各々 8.5×10^2 細胞)、コロニーを形成するまで3~4日培養した。リン酸緩衝生理食塩水(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。

血清及び血漿：マウス血清は、NS1抗体陰性血清として非免疫血清、及び陽性血清としてJEV感染マウス血清を用いた。JEV感染マウス血清は、prM及びE遺伝子組込みプラスミドを接種することにより免疫したマウスをJEVにより攻撃した後、経時的に採取した血清である。またヒトの検体は、NS1抗体陰性検体としてJEVの曝露を受けていないアメリカ人血清、及び陽性検体としてタイ患者血漿を用いた。

NS1抗体測定法：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。検体や標識抗体の希釈液には、2次抗体と同種の血清を最終濃度1%になるように添加した。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。細胞質、特に核膜周辺の染色、またコロニー間における染色強度の差を指標にして抗体陽性、陰性を判定した。陽性反応を示した血清の最高希釈度をNS1抗体価とした。

C. 研究結果

NS1抗体測定条件の決定：この測定法は、多数の検体が処理できるよう簡便、迅速、経済的であり、また

判定ができるだけ客観的になるように染色結果が分かりやすいものでなければならない。そのために、まず以下の条件を定めた。

1. 96穴マイクロプレートを使用する。
2. 視野の中に発現細胞クローンと非発現細胞クローンのコロニーが同時に観察できるようにする。コロニー間での染色強度の差により、判定しやすくなる。
3. 2倍階段希釈血清を用いて抗体価として結果を表す。
4. アビジン・ビオチン染色により、感度を高めると同時に終末点を判定しやすくする。

これらの条件の下に、マウス及びヒトの検体を用いた予備実験を行った。JEV免疫マウス血清及びタイ患者血清を用いてNS1発現細胞から抗体測定に十分な量のNS1の発現があることを確認した。陽性染色例を図1に示す。

組換えワクシニアウイルスにより発現させたNS1抗原との比較：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。組換えウイルスによる抗原は、既報(Konishi et al., *Journal of Virology* 73, 5527-5534, 1999)においてマウス血清中NS1抗体測定に用いたが、ウイルス感染に基づく細胞変性が難点であった。用いた検体は、prM及びE遺伝子導入により免疫したマウスを攻撃後、経時的に採取した血清である。これらのマウスにおいて、攻撃前の抗体はprM及びEに対してしか誘導されていないので、攻撃後初めてNS1抗体が誘導される。しかも、Eに対する免疫を既に有しているマウスは攻撃によ

り死亡せず、従って感染後のNS1抗体価の推移を調べる材料として適する。両抗原を用いて抗体価を測定し比較した結果を図2に示す。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。

患者と健常人におけるNS1抗体価の比較：タイ患者血清4検体、及びアメリカ健常人血清3検体を、1:5から2倍階段希釈し、NS1抗体価を測定した(表1)。タイ患者血清においては、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、従って反応の終末点も判定が容易であった。これらの検体においては1:640から1:1280のNS1抗体価が示された。しかし、1:5から1:20希釈においては高い非特異反応が認められ、NS1発現細胞と非発現細胞との染色強度における差が識別困難であった。

高い非特異反応は、アメリカ健常人血清にも認められ、患者検体で判別可能な1:40をこの測定系の検出限界とした。非特異反応が認められるが、この測定系により患者と健常人の検体におけるNS1抗体のレベルが明確に区別できることが示された。

D. 考察

高年齢者以外に日本脳炎ワクチンの追加接種を受ける成人が稀であるにもかかわらず患者発生が少ないということから、宿主が自然界において蚊からの暴露を受け、JEVの感染を許し、それに対する2次免疫応答を誘起することにより防御が成立していると推察される。すなわち、ワ

クチンの防御効果はsterile immunityではなく、感染は許すが発病は許さないタイプの防御であること、そしてそれがほとんどの日本人に当てはまることが想定できる。ヒトにおける感染状況を把握することは、現行のワクチンの防御機構解明に重要であり、さらにこの防御機構は新しいワクチンを開発する上に不可欠の情報となる。

アビジン・ビオチンの利用により感度を増幅した今回のNS1抗体測定系においては、希釈度1:20以下の検体を判定することは困難であった。本実験では高いNS1抗体を持つ患者検体を用いたが、不顕性感染者や、感染から長期経過したヒトにおいては低抗体価が予想されるため、疫学調査に用いるためには、1:5や1:10の希釈度でも検出可能な抗体測定法が必要とされるであろう。

非特異反応を下げるための工夫の1つとして、吸収操作を試みた。マイクロプレートに固定したNS1非発現細胞により、あらかじめヒト血清または血漿検体を各10分間で合計12回吸収してから測定することにより、1:20希釈でも判定できるようになった。しかし、吸収操作は煩雑であり多数検体の処理には適さない。また、カゼインを添加したPBSをブロッキング及び検体や試薬の希釈液として使用することにより、1:5から1:20希釈における非特異反応は軽減した。しかし、NS1発現細胞における特異反応も軽減し、結果として非発現細胞との染色強度の差は識別困難であった。高濃度の検体におけるプロゾン効果は、感度を高めるアビジン・ビオチン染色系の特徴であるかもしれない。

間接蛍光抗体法を試みたが、1:5希

釈において発現細胞と非発現細胞を識別できたものの、検出感度が8倍から32倍低下した。また、アビジン・ビオチンで反応を増幅しない系、すなわち検体と反応後、パーオキシダーゼ標識抗ヒトIgGにより抗体を検出する方法においては、染色が弱いため、発現・非発現細胞を識別できなかった。従って、NS1連続発現細胞を抗原とした免疫染色の系においては、アビジン・ビオチンによる増幅系が必要と考えられる。

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連続発現細胞クローンの樹立』に述べたように、我々が開発中の日本脳炎やデングに対するDNAワクチンは、動物（マウスあるいはブタ）に中和抗体あるいは防御免疫を誘導する。ワクチンにより免疫した動物またはヒトがJEV感染を受けた時に、どれくらいのレベルの増殖が宿主内で起こるのかを調べる1つの指標として、NS1抗体に着目することが可能である。本研究におけるNS1抗体測定法の確立は、新型ワクチンの効力評価に有用であると考えられる。

E. 結論

ヒトにおけるJEV感染状況を調べるため、NS1に対する抗体測定系を確立した。現行ワクチンの防御機構解明に、また新型ワクチンの開発に有用であると考えられる。

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.

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) .*

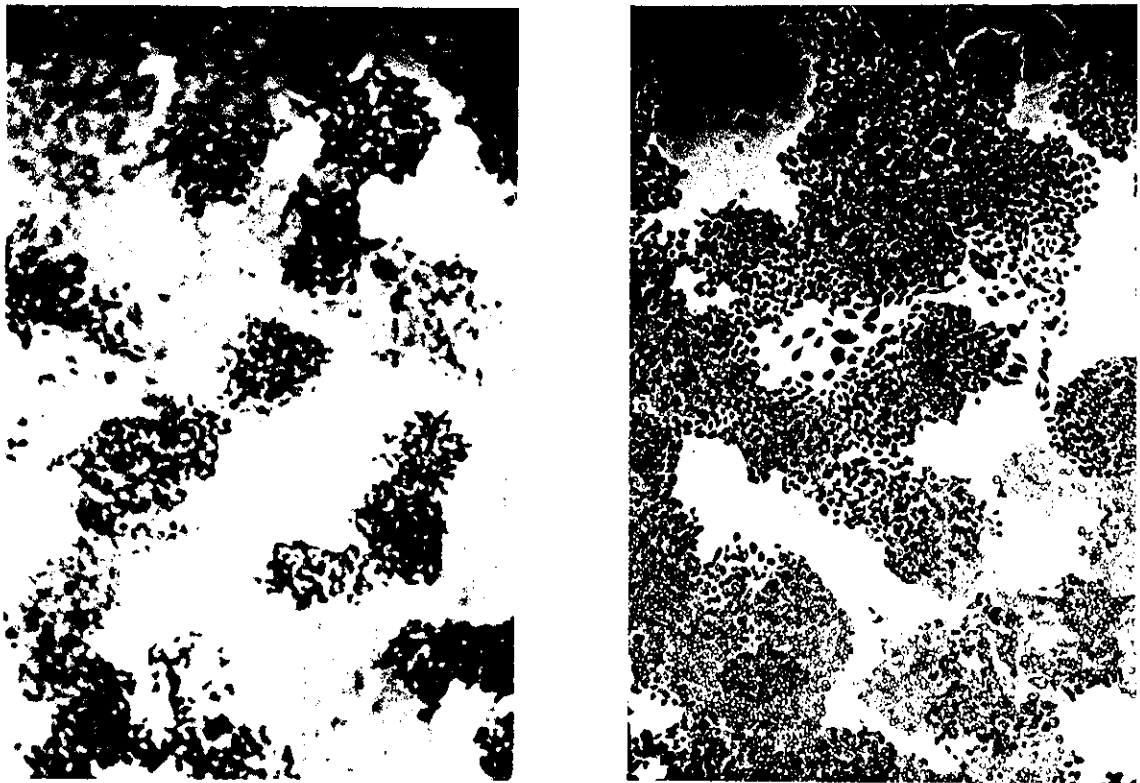


図1. 免疫染色によるNS1抗体測定法における陽性染色例。

JEV感染マウス血清（左）及びタイ患者血漿（右）の1:40希釈における染色像。コロニー状に濃淡ができ判定しやすい。

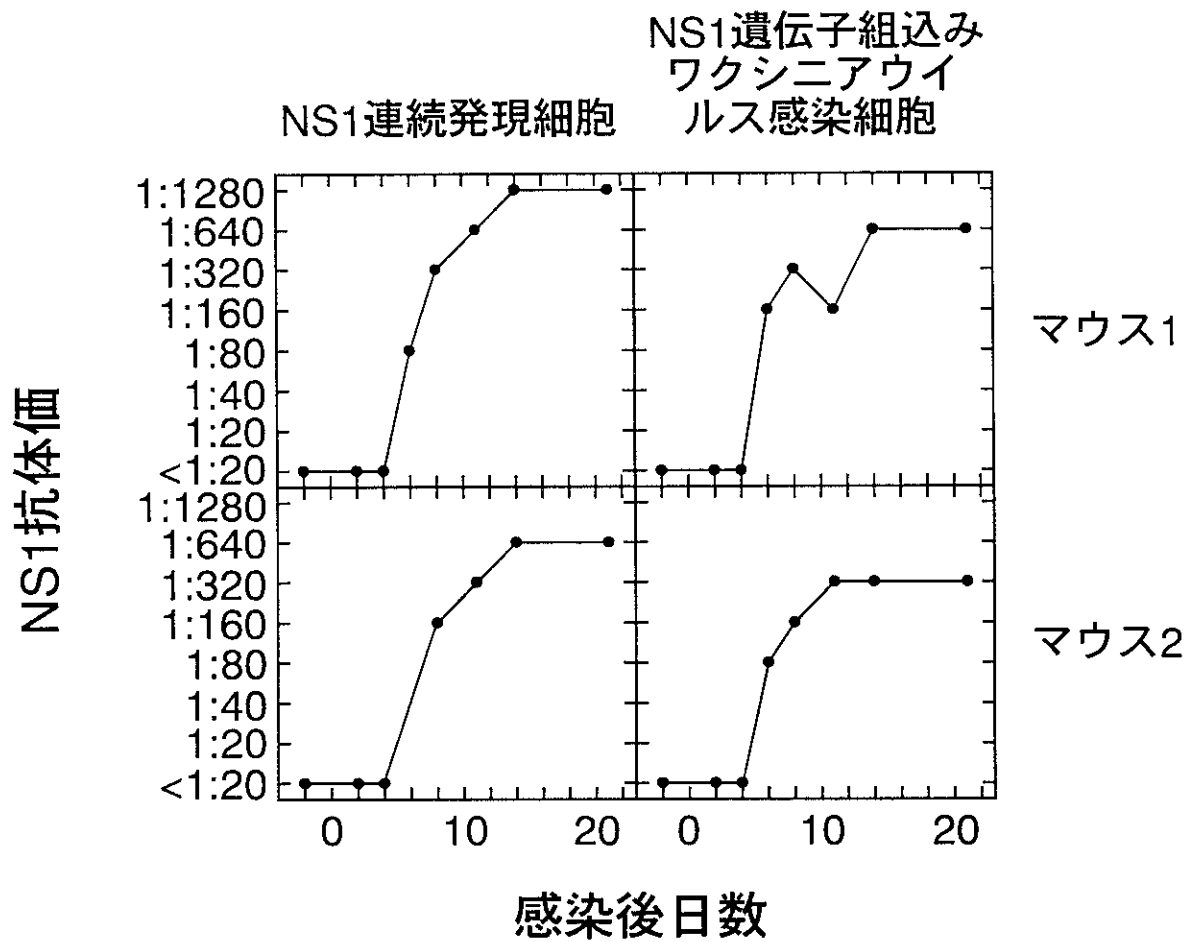


図2 NS1連続発現CHO-K1細胞（左）とNS1遺伝子組込みワクシニアウイルス感染HeLa細胞（右）を抗原としたNS1抗体測定法の比較

prM及びE遺伝子組込みプラスミドを接種することにより免疫したマウス（マウス1、マウス2）をJEVにより攻撃した後、経時的に採取した血清を用いた。

表 1. ヒト検体における NS1 抗体測定結果。

患者検体	判定 (? : 判定不可能、+ : 陽性、- : 陰性)											抗体価
	1:5*	1:10	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640	1:1280	1:2560	1:5120	
タイ患者血漿 PT1	?	?	+	+	+	+	+	+	-	-	-	1:640
タイ患者血漿 PT3	?	?	?	+	+	+	+	+	+	-	-	1:1280
タイ患者血漿 PT5	?	?	+	+	+	+	+	+	+	-	-	1:1280
タイ患者血漿 PT7	?	?	?	+	+	+	+	+	-	-	-	1:640
米国健康人血清 1	?	?	?	-	-	-	-	-	-	-	-	<1:40
米国健康人血清 2	?	?	?	-	-	-	-	-	-	-	-	<1:40
米国健康人血清 3	?	?	?	-	-	-	-	-	-	-	-	<1:40

*希釈度

分担研究報告書

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

主任研究者 倉根一郎（国立感染症研究所ウイルスⅠ部）
共同研究者 只野昌之（琉球大学医学部ウイルス学講座）
馬 紹平（琉球大学医学部ウイルス学講座）
新川 武（琉球大学医学部寄生虫学講座）

研究要旨：コレラトキシン B サブユニット(CTB)と他の蛋白の融合蛋白を発現する新しい植物発現ベクターpBI121CTB を作製した。日本脳炎ウイルス(JEV)遺伝子cDNAのエンベロープ構成蛋白(MおよびE蛋白)領域を種々のサイズで調整し、pBI121CTBのCTB領域下流にインフレームになるように挿入してpBI121CTB/JE シリーズを作製した。これらのプラスミドを植物に外来遺伝子を導入する際に用いられる土壌細菌アグロバクテリウムにトランスフォームし、プラスミドの安定性および発現の有無を検討した。制限酵素による断片のサイズ(制限酵素パターン)から、E蛋白領域の上流にM蛋白領域の一部を有するコンストラクトでは欠失変異が生じたと考えられたが、E蛋白領域のみを含むコンストラクトは、制限酵素パターンに変化は見られなかった。E蛋白のC末端近傍の162アミノ酸残基をコードするcDNAを含むコンストラクト(pBI121CTB/JEC3)をトランスフォームしたアグロバクテリアで、CTBとJE蛋白の融合蛋白の発現が認められた。pBI121CTB/JEC3をトランスフォームしたアグロバクテリウムの粗抽出物のマウスへの鼻腔内、経口的、あるいは腹腔内接種で、免疫した全てのマウスにpBI121CTB/JEC3の発現蛋白(CTB/JEC3)に対する抗体の産生が確認されたが、JEワクチンやCTBに対する特異抗体は検出されなかった。また、濃縮JEワクチンをコレラトキシンと共に経鼻的に免疫したマウスでは全てのマウスの血液中に、JEワクチン、CTB/JEC3およびCTBに対する抗体が高いレベルで検出された。

A. 研究目的

日本脳炎(JE)の起因ウイルスは水田等で繁殖するコガタアカイエカによって多くの種類の動物に媒介されることが知られている。特に、ターンオーバーの早い食肉用ブタは本ウイルスの増幅動物として重要である。

本症の死亡率は高く、生存しても重度の後遺症が高率に残ることから、流行地では公衆衛生上の大きな問題となっている。かつて、我が国では本症が多発していたが、現在は数えるほどに減少してしまった。その原因として、住環境の整備、養豚形態の変

化、ワクチンの普及などが考えられる。しかし、アジアの発展途上国、特に稲作と養豚が盛んな地域では、依然として本症が猛威を振るっているため、本症の予防対策が強く望まれている。

現行の JE ワクチンは、感染マウス脳由来の不活化ワクチンが用いられているが、高度に精製する必要があるために高価である。したがって、経済力のない途上国における同ワクチンの普及には、当該国の経済発展を待つか、先進国の援助が必要である。現在の発展途上国が本症の予防対策を自力で行うには、低コストで大量生産可能な新しい日本脳炎ワクチンの開発が必須である。

我々は、上記の条件を満たす新しいワクチン開発の戦略として、粘膜免疫型のワクチンが日本脳炎の予防に使えるかと考えた。コレラトキシン B (CTB) の 5 量体は GM1 ガングリオシドをレセプターとして粘膜細胞表面に結合することが知られている。新川らは CTB とインシュリンの融合蛋白を植物で発現させ、これをマウスに経口投与することで、CTB とインシュリンに対する特異抗体が粘膜から分泌される IgA 抗体のみならず、血中にも IgG 抗体として産生されることを報告している。我々は新川らの方法を応用して、CTB と日本脳炎蛋白の融合蛋白を遺伝子工学的に作製し、これが経口的あるいは経鼻的に免疫可能か否かを確認する目的で本研究を行った。

B. 研究方法

発現ベクターの構築：

発現ベクターの構築の概略を 図 1 に示した。本研究で用いた発現ベクターの構築には市販のベクター pBI121 を用いた。コ

レラ菌遺伝子の一部を含むプラスミド pM2 を鋳型に、コレラトキシン B (CTB) 領域を PCR 法で増幅し、この DNA 断片を pBI121 のカリフラワーモザイクウイルス (CaMV)35S プロモーター下流の GSU 遺伝子と置換し、pBI121CTB を構築した。このコンストラクションでは、CTB 領域の直下に 4 つのアミノ酸からなるヒンジをコードする領域、他の蛋白遺伝子を挿入するための制限酵素サイト、および最下流に膜貫通用のリーダーシークエンス領域と終止コドンも挿入した。日本脳炎ウイルス (JEV) 遺伝子 RNA を鋳型とする RT-PCR 法で増幅した種々の長さの JEV エンベロープ蛋白領域の DNA 断片を pBI121CTB の CTB 領域下流にインフレームで挿入し、pBI121CTB/JE シリーズを構築した (図 1b)。大腸菌でクローニングした pBI121CTB/JE シリーズは、組換え領域の塩基配列を確認した後にアグロバクテリウムにエレクトロポレーション法でトランスフォームした。

GM1-ELISA による発現の確認：

アグロバクテリウムにおける発現は GM1-ELISA で確認した。pBI121CTB/JE シリーズをトランスフォームしたアグロバクテリウム粗抽出物を ELISA プレートに固相化された GM1 ガングリオシドと反応させることで、5 量体を形成している融合蛋白が捕捉される。次に、抗 CTB ウサギ抗体あるいは抗 JE マウス抗体を反応させる。続いて、AP 標識抗ウサギ IgG ヤギ抗体、あるいは HRPO 標識抗マウス IgG ウサギ抗体を反応させ、最後にそれぞれの標識酵素に対する基質溶液と反応させて吸光度を測定する。各ステップは 37°C で 1 時

間反応させ、各ステップ間にプレートを PBS で 4 回洗浄した。

マウスへの免疫：pBI121CTB/JE シリーズをトランスフォームしたアグロバクテリアの粗抽出液を免疫原として、4 週齢の ddy マウス(1 群 5 匹)に経鼻(50 μ l/mouse)、経口(500 μ l/mouse)および腹腔(50 あるいは 5 μ l/mouse)のルートで接種した。経口投与の抗原液には、胃酸の攻撃を避ける目的で炭酸水素ナトリウムを重量比で 3% 加えた。週に 1 度の接種を 4 回行い、各接種の前に尾部から採血を濾紙法で行った。コントロールとして、JE ワクチンの経鼻接種も行った。JE ワクチンの接種は粘膜免疫アジュバントとしてコレラトキシンの存在化および非存在化で行った。

ELISA による抗体の測定：4 回目の免疫から 1 週間後(免疫開始から 5 週間後)に採血されたマウス血清中の JE 抗体を IgG-ELISA で測定した。JE ワクチンを抗原としてコートしたプレートに希釈(1:100)したマウス血清をいれてインキュベートした。次に HRPO 標識抗マウス IgG ウサギ抗体を反応させ、標識酵素に対する基質液で呈色反応を行った。各ステップの反応条件、およびプレートの洗浄は上記の GM1-ELISA と同様に行った。

C. 研究結果

アグロバクテリアにおけるプラスミドの安定性と発現の確認：

アグロバクテリアにおける pBI121CTB/JE シリーズの安定性を制限酵素による切断パターンで検討した(表 1)。M 蛋白領域および E 蛋白領域の両方を含

む pBI121CTB/JE の A シリーズでは、欠失変異を示唆する結果となり、以後の実験に供することは出来なかった。一方、M 蛋白領域を含まない、E 蛋白領域のみを挿入した B シリーズおよび C シリーズでは、欠失を示唆する結果は得られなかった。B および C シリーズでトランスフォームしたアグロバクテリアの粗抽出液を GM1-ELISA で測定したところ、pBI121CTB/JE(C3)でトランスフォームしたアグロバクテリアの粗抽出液には、抗 CTB 抗体のみならず抗 JE 抗体とも反応する抗原が検出されたが、他のプラスミドでは何れの抗原も検出されなかった(表 1)。

マウス免疫原性の検討：

pBI121CTB/JE(C3)でトランスフォームしたアグロバクテリアの粗抽出液(CTB/JEC3)、あるいはコントロールのために JE ワクチンを接種したマウスから採取された血清中の抗体を GM1-ELISA あるいは IgG-ELISA で測定した。表 2 の測定結果から、CTB/JEC3 を免疫したマウスでは、免疫ルートにかかわらず全てのマウスで CTB/JEC3 に対する IgG 抗体が産生された。しかし、固相抗原に JE ワクチンあるいは CTB を用いた IgG-ELISA では特異抗体は検出されなかった。CTB/JEC3 を腹腔に免疫したマウスでは、アグロバクテリアの菌体成分に対する抗体、固相抗原を用いなかったときに反応する非特異抗体が産生されたが、鼻腔および経口接種の群では殆ど認められなかった。このことは、CTB-JE 融合蛋白の粘膜免疫では、他の成分が圧倒的に多いと考えられる菌体粗抽出液でも菌体成分に対する免疫

応答が起こりにくいことを示唆する。いいかえると、CTB-JE 融合蛋白は混入している他の成分蛋白に対して、アジュバントとしての効果はないと示唆される。すなわち、融合蛋白を粘膜免疫に用いる場合は、抗原に高い精製度が要求されないということを示す。一方、JE ワクチンを鼻腔内に接種したマウスにおける JE 抗体陽性率は、コレラトキシン(CT)と共に接種した群では100%なのに対して、CT を用いなかった群では60%と低く、抗体価を反映する ELISA 吸光度も低かった。しかも、JE ワクチンのみを鼻腔内接種したマウスの血清では、CTB のみならず CTB/JEC3 と反応する抗体も検出されなかった。これらのことは、CT が粘膜免疫アジュバントとして強く働いたことを示している。しかし、この免疫方法は JE 抗原以外に他の成分が混じっていた場合、CT のアジュバント効果によりそれらの成分蛋白(不純物)にたいしても免疫応答が起こると予想される。したがって、このような免疫方法で用いられる抗原には高い精製度が要求されると考えられる。

D. 考察

JE-E 蛋白領域の大部分を含む pBI121CTB/JE の B シリーズによるアグロバクテリウムのトランスフォーメーションでは、CTB および JE 抗原の何れも検出されなかった。このことは、B シリーズで発現が起きていないことを示すのか、あるいは発現蛋白が立体構造の変化などにより、5 量体を形成できないために検出されなかったのかは明らかではない。今後、ウエスタンブロッティング等の方法で菌抽出液の検討を行う必要がある。発現していないと

すると、制限酵素パターンでは検出されない変異、例えば点変異による終止コドンの生成やフレームシフトなどが起きている可能性が考えられる。最近の実験で、アグロバクテリア内の発現ベクター B シリーズの融合蛋白コード領域の塩基配列にはアミノ酸置換が2、3カ所に認められたが、フレームシフトやストップコドンの発生を伴う変異は認められなかった (data not shown)。また、ベクターは植物で発現するように構築されているので、挿入した JE 蛋白領域が C シリーズより3倍以上大きい B シリーズでは、アグロバクテリウムにおける発現効率が低いのかも知れない。今後、C シリーズおよび B シリーズを植物に導入して、発現の有無などを検討する予定である。

作製されたコンストラクトのうち、pBI121CTB/JE(C3)をトランスフォームしたアグ

ロバクテリアで、GM1 ガングリオシドと結合する抗原が CTB 抗体および JE 抗体の両で検出された。この結果は、JE 抗原と CTB との融合蛋白が発現し、5 量体を形成していることを強く示唆する。また、このプラスミドでトランスフォームしたアグロバクテリアの粗抽出液によるマウスの経口、経鼻、腹腔内への免疫実験では、CTB および JE ワクチンに対する特異抗体の産生は認められなかったが、免疫に用いた抗原に対する IgG 抗体の産生は認められた。pBI121CTB/JE(C3)で発現した融合蛋白の抗原性が CTB や JE 抗原が本来持っている抗原性から変化した可能性が考えられるが、この融合蛋白は高度免疫ウサギ CTB 抗体および高度免疫マウス JE 抗体用いた

GM1-ELISA で強く反応した。したがって、それぞれの構成部分の抗原性の一部は保持されていると考えられる。また、発現融合蛋白には粘膜からの免疫原性があることから、粘膜免疫ワクチンとして応用の可能性は残っている。今後は、プロモーターのタンデム化、ヒンジ部分の伸展などを行い、ベクターの発現効率と発現蛋白の免疫原性保持について改良する予定である。

E. 結論

植物の遺伝子組換えに用いられるベクターを用いて、コレラトキシンB (CTB) と日本脳炎 (JE) ウイルス抗原の融合蛋白を土壌細菌アグロバクテリアで発現させることに成功した。この融合蛋白のマウス免疫実験では、腹腔内接種のみならず経鼻的あるいは経口的接種でも、免疫に用いた抗原に対する血中抗体産生を誘導できたが、JE 抗原および CTB に対する特異抗体産生は誘導できなかった。これらのことから、CTB-JE 融合蛋白は粘膜免疫における免疫原性は保有しているものの、抗原性が変化していると思われた。今後、本来の抗原性を保持した状態で融合蛋白を発現させる改良が必要である。また、本研究で、現行の JE ワクチンでも鼻腔粘膜からの免疫が可能であることが初めてわかった。また、インフルエンザワクチンの鼻腔接種でアジュバントとして用いられるコレラトキシン (CTA+CTB) を加えることで、日本脳炎ワクチンでも免疫が強化されることがわかった。今後、さらに改良は必要であるが、日本脳炎の粘膜免疫は将来の日本脳炎ワクチンのオプションの一つに加えられると考える。

F. 研究発表

1. 論文発表

Saito M, Sunagawa T, Makino Y, Tadano M, Hasegawa H, Kanemura K, Zamami Y, Killenbeck BJ, Fukunaga T: Three Japanese encephalitis cases in Okinawa, Japan, 1991. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 30 277-279. (1999)

福永利彦, 只野昌之: デング熱, デング出血熱の実験室内診断—ウイルス遺伝子検査を中心に—. *検査と技術(医学書院)* 27 1239-1244 (1999)

Sakugawa H, Nakasone H, Nakayoshi T, Kawakami Y, Miyazato S, Kinjo F, Saito A, Ma S-P, et al: Hepatitis delta virus genotype IIb predominates in an endemic area, Okinawa, Japan. *J Med Virol* 58 366-372. (1999)

Arakawa T, Chong DKX, Yu J, Hough J, Engen PC, Elliott J, Langridge WHR: Suppression of autoimmune diabetes by plant delivered CTB-GAD. *Transgenics* 3:1-10. (1999)

新川 武, 佐藤良也: 食べるワクチン: トランスジェニック植物の応用. *感染・炎症・免疫* 29:46-48. (1999)

Arakawa T, Yu J, and Langridge WH: Food plant-delivered cholera toxin Bsubunit for vaccination and immunotolerization. *Adv Exp Med*

Biol464:161-178. (1999)

Arakawa T, Chong DK, Slattery CW, and Langridge WH: Improvements in human health through production of human milk proteins in transgenic food plants. *Adv Exp Med Biol* 464:49-59. (1999)

Arakawa T and Sato Y: Food plant-synthesized cholera toxin B subunit as an immunogen and antigen delivery system. *Mucosal Immunol Update* 7:14-17. (1999)

Langridge WH and Arakawa T: Plant-based vaccine for immunotolerization. *Mucosal Immunol Update* 7:6-7. (1999)

2. 学会発表

只野昌之, 馬 紹平, 新川 武, 倉根一郎, 福永利彦: 植物発現ベクターによる日本脳炎ウイルス抗原の発現. 第 47 回日本ウイルス学会総会 (1999)

馬 紹平, 只野昌之, 長谷部太, 清水博之, 福永利彦: HCV 3'X 配列を持つデングキメラウイルスの性状. 第 47 回日本ウイルス学会総会 (1999)

馬 紹平, 佐久川廣, 只野昌之, 福永利彦: 沖縄の genotype IIb HDV 株の全塩基配列. 第 47 回日本ウイルス学会総会 (1999)

只野昌之, 馬 紹平, 倉根一郎, 福永利彦: 植物発現ベクターによる日本脳炎ウイルス抗原の発現. 第 36 回日本ウイルス学会九

州支部総会 (1999)

新川 武: トランスジェニック植物ワクチン. 南方資源利用技術研究会特別講演 (1999)

新川 武: 「21 世紀の新食糧戦略—機能、素材、そして生産—」、トランスジェニック植物ワクチン. 日本農芸化学会主催・第 24 回「化学と生物」シンポジウム (1999)

新川 武、佐藤良也: 感染症に対する植物ワクチン. 第 40 回日本熱帯医学会総会 (1999)

Vero 細胞を用いた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 国立感染症研究所 中山幹男
協力研究者 国立感染症研究所 松野重夫
旭光学工業（株） 山本 晃

要旨

現行の日本脳炎不活化ワクチンは、マウス脳で培養させたウイルスを原料としている。そのために、現行のワクチンには、脳物質が混入している可能性がある。脳物質を含まない安全なワクチンを開発する目的で、Vero 細胞を用いた日本脳炎不活化組織培養ワクチンを試作するための基礎的検討を行った。

1. マウス脳で増殖させたウイルスと、Vero 細胞で増殖させたウイルスの遺伝学的性状を、E 蛋白領域の塩基配列で比較したところ塩基配列で 4 箇所、アミノ酸配列で 2 箇所変化していた。しかしながら、Vero 細胞でクローニングしたウイルスを再びマウス脳で増殖させた後、そのウイルスを Vero 細胞に戻したところ、変化はみとめられず、100%塩基配列が一致していた。このことから、先の遺伝的変化は、ウイルス増殖細胞の違いの影響ではなく、セレクションによるものと推測された。
2. ハイドロキシアパタイトセラミックを用いた、カラムクロマトグラフィによる、日本脳炎ウイルスの効率の良い精製法を開発した。この方法を用いることにより、組織培養日本脳炎不活化ワクチンは、大量生産における高度の精製が可能になり、安価で安全度の高いワクチンの実用化に役立つと思われた。

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。しかし、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。患者発生の強力な抑制因子は、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重要性を、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必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。

方法及び材料

1. ウイルス及び Vero 細胞

ウイルスは、日本脳炎ウイルス (J E V) 北京株を用いた。Vero 細胞は、ウイルス感受性、増殖性に優れた、ATCC の JWCB002 Vero 細胞を用いた。組織培養不活化日本脳炎ワクチンの試作に用いるウイルスは、現在マウス脳由来不活化日本脳炎ワクチンに用いているマウス脳 4 2 継代ウイルスを Vero 細胞で 4

代継代し、試作ワクチン製造では Vero 細胞継代数が 5 代になるウイルスを用いた。

2. Vero 細胞増殖ウイルスの遺伝学的解析

Vero 細胞で増殖させたウイルスの遺伝学的解析は、Vero 細胞で 1 代及び 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。

3. Vero 細胞を用いた日本脳炎ウイルス (J E V) 北京株の大量培養は、150 cm² フラスコ 130 本を用意し、細胞濃度を 2×10^5 cell/ml に調製した 10% ウシ胎児血清を含む MEM 培地 (0.11% Na₂HCO₃) を各フラスコに 40 ml ずつ分注した。37℃ 7 日間静置培養後、培養上清を除去し、FCS を含まない MEM で洗浄した。ウイルスを MOI 0.1 で細胞に感染させ 90 分間ウイルス吸着を行った後、FCS を含まない、0.22% 濃度の Na₂HCO₃ 含む MEM 培地で、37℃ 4 日間培養し、ウイルス増殖培養上清 5,200ml 得た。

4. ウイルスの精製法の開発

Vero 細胞で培養後回収したウイルス培養上清 5,200ml は、低速遠心 (3,000rpm/min・20分) で細胞を除去し、更に高速遠心 (6,000rpm・60分) を行い、生じた沈澱物を除いた後、0.22 μm メンブラン膜でのミリポア濾過を行った。回収した濾液の濃縮には、限外濾過装置 (C.M.W.500Kd) を用い、濃縮後は、

M/100 pH7.2 燐酸緩衝液 4,000ml を用いて環流洗浄し、最終的には 120ml の限外濾過ウイルス濃縮液を得た。更に硫酸プロタミンを用いた雑蛋白除去操作を行った。

このウイルス濃縮液をプロタミン硫酸処理するにあたって、最適なプロタミン濃度を検討した。種々の濃度のプロタミン処理を行ったウイルス液について、ウイルスのHA活性を測定し、精製度は SDS・PAGE法を用いて検証した。

得られた成績から、プロタミン処理の至適濃度は、1mg/ml であることが明らかになったため、ウイルス濃縮液のプロタミン処理はこの条件下で行い、粗精製ウイルス液 120ml を得た。

更にウイルスの精製を行うために、粗製精ウイルス液を 80ml と 40ml に分割し、それぞれ超遠心分離精製法に 40ml、ハイドロキシアパタイトクロマトグラフィ精製法に 80ml 用いた。

4-1 ハイドロキシアパタイトセラミックスを用いたクロマトグラフィカラムによるウイルスの精製

ハイドロキシアパタイトカラムおよびクロマトグラフィ装置内部は、300ml の 1N、NaOH で滅菌、洗浄した後、1,000ml の 10mM 燐酸緩衝液 pH7.0 で平衡化した。カラムの洗浄、サンプルの導入および溶出に使用したリン酸ナトリウム緩衝液はすべて 121°C、15 分間のオートクレーブ処理を行ったものを用いた。

このカラムに、プロタミン処理済みのウイルス溶液 80ml を、ハイドロキシアパタイトセラミックス (Macro-Prep CHT Type-2, 40 μ m) を充填した容量 100ml のカラム (内径 44mm \times 長さ 65mm) に対してペリスタポンプで導入した。試料導入後のカラムは、100ml の 10mM リン酸ナトリウム緩衝液 pH7.0 で洗浄し、カラムに吸着しない成分を除去した (Fr#01、#02)。さらに、150mM (130ml)、400mM (70ml) のリン酸ナトリウム緩衝液 (pH7.0) により、カラムに吸着している成分を溶出させ回収した (Fr.#1、#2、#3、#4、#5 Fig-2)。クロマトグラフィは、すべて流速 10ml/min にて行った。

クロマトグラフィにより得られた各分画は、感染価 (ブランク法)、ガチョウ赤血球凝集活性 (HA 価)、蛋白量、SDS-PAGE およびウエスタンブロット法等の測定を行い、ウイルス精製度または回収率を検討した。感染価、HA 価の測定は、得られた分画の脱塩、濃縮をせずに行った。SDS-PAGE およびウエスタンブロット分析では、得られた分画を 5,000d の限外濾過膜 (Biomax-5、ミリポア製) を用いて 10mM (pH7.0) リン酸緩衝液に置換し、濃縮を行った。ウエスタンブロット法では、高度免疫抗日本脳炎ウサギ感染血清を用い、二次抗体にはペルオキシダーゼ標識抗ウサギ IgG ヤギ抗体を使用した。

4-2 超遠心分離精製法

プロタミン処理済みのウイルス

溶液 40 ml を用いた。29,000 rpm 4 時間の超遠心を行い、ウイルスを濃縮し、沈殿を 10mM pH7.0 リン酸緩衝液に再浮遊し、HA 価 10,240 の 3 ml ウイルス浮遊液を得た。蔗糖濃度 20% から 50% の濃度勾配を 30 ml 作製した遠心チューブに、3 ml のウイルス濃縮液を重層し、28,000 rpm, 4 時間遠心後、管底よりペリスタポンプにより分画を行った。分画は、HA 活性、感染価を測定し、ウイルスを含む分画については、SDS-PAGE により精製度を観察した。

成績

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

マウス脳で増殖させた北京株と、そのウイルスを Vero 細胞で 5 代継代したウイルスの、E 蛋白領域の塩基配列とアミノ酸配列を比較した。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% であった。この変化が、マウス脳から Vero 細胞にウイルス増殖の細胞が変わることによるのかを調べる目的で、ウイルスのクローニングを Vero 細胞を用いて行い、クローニングされたウイルスをマウス脳に接種した。このマウス脳で増殖したウイルスを再び Vero 細胞で増殖させ、そのウイルスの塩基配列を、マウス脳に接種する前のウイルスと比較したところ、塩基

配列には変化が認められず、100% 一致していた。(Fig.—1, 2) このことは、マウス脳から Vero 細胞にウイルス増殖の場が変更になっても、そのことによる影響は起こらないことが推察された。つまり、クローニングしない前のウイルスは、ミックスポピュレーションであり、クローニングしない場合の変化は、セレクションによる変化と思われた。

ウイルス濃縮液のプロタミン硫酸処理におけるプロタミン硫酸の最適濃度の検討

Vero 細胞で増殖させ、限外濾過装置で濃縮したウイルス液のプロタミン硫酸の最適濃度の検討を行った。通常、マウス脳を用いた場合とは異なり、組織培養の場合は、ウイルス液の蛋白量が少ないため、プロタミン処理を省くことがある。ウイルスの回収率が悪くなる事もその一因である。我々は、精製度の高いワクチン作製を目的にしてプロタミン処理条件の検討を行った。プロタミン最終濃度を 2.0mg から 0.03mg まで順次変えて、ウイルス濃縮液に等量加え、4℃ 30 分反応させた後、7,000rpm 10 分間遠心した上清について HA 活性を測定し、SDS-PAGE により精製度を確認した。HA 活性での回収率は、2mg から 0.03mg まで 100% と変わらなかったが (Table.—1)、SDS-PAGE での成績では、プロタミン濃度が 0.06mg 以下になるとウイルス以外の蛋白が除去されていなかった (Fig.—3.)。

これらの成績からプロタミン処理でのプロタミン濃度は1mg/mlが最適と思われた。この濃度でのプロタミン処理前のウイルス液の蛋白量は、1,260 μ g/mlであったが、処理後は490 μ g/mlとなり、約1/2.5に蛋白量が減少し、この条件でのプロタミン処理は、ウイルスの回収率も高く、精製に役立つ事がわかった。

ハイドロキシアパタイトセラミックを用いたクロマトグラフィカラムによる組織培養日本脳炎ウイルスの精製

ハイドロキシアパタイトカラムを用いてプロタミン処理ウイルス液のクロマトグラフィによる精製を行った。カラムに吸着しない Fr.#0-1, #0-2 とカラムに吸着した後150Mm, 400Mm の磷酸ナトリウム緩衝液を用いて溶出させた Fr.#1, #2, #3, #4, #5 について、ウイルスの感染価、HA 価、蛋白量の測定を行い、更に、SDS-PAGE、ウエスタンブロット電気泳動を行った (Fig.-4, Table-.2)。カラムに吸着しない Fr.#0-1, #0-2 の蛋白量はそれぞれ30 μ g/ml、14 μ g/mlであったが、ウイルスの感染価、HA 価はいずれも4倍以下を示し、ウイルスは認められなかった。

一方、ハイドロキシアパタイトカラムに吸着した蛋白を、150Mm、次いで、400mMの磷酸ナトリウム緩衝液で溶出させた Fr.#1 から Fr.#5 分画について SDS-PAGE 分析を行っ

てみたところ、Fr.#1 から Fr.#3 には、ウイルス以外の蛋白が多く含まれていた。しかしながら、Fr.#4 は、ウイルス E 蛋白 (53K) が大部分を占めており、ウエスタンブロットでの成績もそれを裏付けていた。Fr.#1 から #3 には、若干の HA 活性、ウイルスの感染価が認められたが、大部分のウイルス活性は Fr.#4 に認められ、ウイルスの回収率は HA 活性で100%、感染価 (PFU) では55.7%であった。

蔗糖密度勾配超遠心分離法によるウイルス液の精製

プロタミン処理ウイルス液の蔗糖密度勾配遠心法による精製を行った。アパタイトカラム精製法に対して、比較するための対象として行った。蔗糖密度勾配遠心後の、画分について HA 活性、感染価、蛋白量、SDS-PAGE を行った結果 (Table.-3, Fig.-5)、精製度は高かったが、ウイルスの回収率においては、2%と極端に低く、ハイドロキシアパタイトカラム精製法と比べて非常に劣っていた。

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、ウイルスの遺伝学的検討とウイルス精製

法を検討した。ウイルスの E 蛋白領域の変化は、ワクチンの抗原性に直接かわる重要な問題である。我々の成績から、マウス脳で増殖させたウイルスを、Vero 細胞に移し変えても塩基配列には変化を起こさないことが明らかとなった。このことは、Vero 細胞で製造したワクチンは、抗原性においても変化しないと推測される。

組織培養ウイルス濃縮液は、プロタミン処理により、精製度を高めることができたが、精製度は十分なものとは言えず、更に精製する必要がある。組織培養における、細胞の増殖には牛血清が高濃度に必要であることから、ウイルス増殖時に、血清の含まない無血清培地を用いても、血清成分のウイルス液への混入は避けられず、ウイルス液の高度精製は、ワクチン開発の重要な課題である。ハイドロキシアパタイトカラムを用いたクロマトグラフィによるウイルス液の精製法は、精製度と回収率の成績から画期的な精製法と考える。特に、ウイルスに対して、感染価などへの影響が少ないことから、ウイルス粒子へのダメージの無い精製法であることが推測された。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。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、実に単純で、一段階での精製法としては、回収率が高く、ウイルス活性に影響を与えず、しか

も、大量のウイルス液の精製に適しており、実用化に適した方法と思われる。

結論

Vero 細胞による、日本脳炎不活化ワクチンの開発での主な課題は、1) ウイルスの抗原性に変わりが無いこと。2) 大量生産が可能で、精製度が高く安全性に問題が無いこと。3) 安価なこと等である。

我々は、ウイルス抗原性については検討していないが、クローニングしたウイルスでの成績から、E 蛋白領域の塩基配列に変化が認められないことから、抗原性は変わらないと推測した。

更にウイルスの精製法について、新しいアパタイトカラムによる精製法を開発した。その方法は、回収率が高く、ウイルス活性に影響を与えず、大量のウイルス液の精製に適していることから実用性の高い方法と思われた。

論文

なし