

た。

D 考察

1895年にRossによって始めて発見されたヤブカ類の寄生原虫(*Gregarina*)はその後、属名が変更され、混乱をきたしたが、現在*Ascogregarina*として報告されている。今までに6種ほどがヤブカ類に寄生していることが報告されており、寄生が宿主の死亡率を高めるとの報告も見られるが、100-200匹程度の栄養体が寄生している状態では、顕著な死亡率の上昇は見られないとの意見が大勢を占めている。我々の感染実験においても、幼虫発育に若干の遅延が認められたが、幼虫死亡率に関しては大きな差は認められなかった。

*Ascogregarina*の感染初期では、栄養体が蚊中腸の上皮細胞内に侵入し、ある程度発育してから中腸内腔に脱出する発育過程を示す。体長20-30 μ m程の初期の栄養体が上皮細胞外へ出ることから、中腸内の細菌等の感染がおこる可能性が考えられる。また、濃厚感染の場合には、蛹期のマルピギー管内に100個以上のガメトシストが形成され、マルピギー管全体の構造は相当破壊されている像が光学顕微鏡レベルで観察される。成虫に羽化した後も、マルピギー管内腔にはオーシストがびっしりつまった状態が3週間以上持続し、排泄等の生理機能の低下が疑われるが、濃厚感染蚊が吸血した場合でも、死亡率が高まることはなく、産卵も未感染蚊と比べ差は認められなかった。今回、3種のヤブカから*Ascogregarina* spp.を分離し、宿主特異性、超微形態学的観察を行った。また、我が国のヒトスジシマカには広範にこの原虫が寄生しており、岩手県より採集したヤマトヤブカからも別種と思われる*Ascogregarina* sp.が分離された。これらの寄生原虫が同所的に存在するヤブカ類分布を規定する要因になっているとの推測もあり、今後、自然宿主以外での原虫の発育や病理的影響を詳細に調べることが重要と思

われる。将来、これらの寄生原虫を抗ウイルス活性などを有する外来遺伝子の運びやとして利用できれば有効な防除法の確立につながるものと考えられる。東南アジア、中南米、南太平洋諸国では急激な人口増加、衛生環境の悪化など種々の困難が存在している。主要なデング熱媒介蚊であるネッタイシマカの発生源対策を地域の協力によって押し進め、外来遺伝子を導入した寄生原虫が将来的に利用できればデング熱の大規模な流行を阻止できるものと考えられる。沖縄本島、宮古島での*Ascogregarina* sp.の寄生率は本州のそれより高い傾向が認められた。今後、これら寄生原虫の混合感染が宿主の発育等に与える影響を詳細に検討したい。

E 結論

本邦産ヒトスジシマカ幼虫に寄生する*Ascogregarina* sp.がどの程度広範に認められるか調べた。その結果、東北、関東、関西、沖縄地方から採集した幼虫から同原虫の寄生を認めた。寄生率および幼虫当たりの寄生栄養体数は発生源や発生場所によって大きな差が見られた。また、岩手県で採集されたヤマトヤブカ幼虫から類似した寄生原虫を分離することが出来た。これらの原虫に加えて、タイ国チェンマイ市で採集したネッタイシマカからも*Ascogregarina* sp.を分離した。3種のヤブカ幼虫より分離した寄生原虫の超微形態を走査電顕で比較したところ、栄養体の後端部の構造とオーシストの表面構造にそれぞれ明瞭な違いが確認され、ヤマトヤブカ由来の*Ascogregarina* sp.は今まで報告されている原虫と形態的また宿主特異性に関して明らかに異なっており新種と考えられた。ヒトスジシマカ由来原虫のオーシストをネッタイシマカに感染させた場合、幼虫発育に若干の遅延が認められたが、死亡率等には影響は見られなかった。また、ヒトスジシマ

カおよびヤマトヤブカ由来原虫オーシストを数種ヤブカ類およびハマダラカ (*Anopheles stephensi*) に感染させたが、多くは栄養体までに不完全に発育が見られたが、ガメトシストの形成は認められず、宿主特異性が高いことが示された。今後、生物的防除法への *Ascogregarina* spp. の利用と外来遺伝子の運びや (遺伝子ベクター) としてこれら原虫を疾病対策に利用する方法を模索する事が Dengue 熱の予防対策に重要と考えられる。

F 健康危険情報

特筆することはない。

G 研究発表

1. 発表論文

1) 二瓶直子、小林睦生 (2000) : 地理情報システムを利用した感染症分布の解析、感染症、30, 1-12

2) 小林睦生 (2001) : 感染症媒介動物—とくに昆虫の研究の現状、総合臨床、50, 431-432

3) Nihei, N. & Kobayashi, M. (2000) The probable expansion of malaria infested areas in East and Southeast Asia as a result of global warming. 国際保健医療、15, 3-13.

4) Sasaki, T., Kobayashi, M., Agui, N. (2000) : Epidemiological potential of excretion and regurgitation by *Musca domestica* (Diptera: Muscidae) in the dissemination of *Escherichia coli* O157:H7 to food. J. Med. Entomol., 37:945-949.

2. 学会発表

1) 小林睦生、二瓶直子、佐々木年則 : 我が国のヒトスジシマカに見られる *Ascogregarina* sp. の寄生状況とその寄生が宿主に与える影響。第 52 回日本衛生動物

学会大会 (那覇市), 2000 年 4 月 1-3 日

2) 二瓶直子、栗原 毅、小林睦生 : ヒトスジシマカの東北地方における分布に及ぼす社会経済的要因。第 52 回日本衛生動物学会大会 (那覇市), 2000 年 4 月 1-3 日

3) 佐々木年則、小林睦生、安居院宣昭 : 蚊体液中に含まれるシアル酸特異的レクチン cDNA の解析。第 52 回日本衛生動物学会大会 (那覇市), 2000 年 4 月 1-3 日

4) 池田 満、佐々木年則、田村和満、小林睦生 : *Anopheles stephensi* の中腸内細菌がネズミマラリアのオーシスト形成および感染吸血後の死亡率に与える影響。第 52 回日本衛生動物学会大会 (那覇市), 2000 年 4 月 1-3 日

5) 富田隆史、高橋正和、小林睦生、安居院宣昭 : 1999 年に東京都内で採取されたコロモジラミの殺虫剤感受性。第 52 回日本衛生動物学会大会 (那覇市), 2000 年 4 月 1-3 日

6) Kobayashi, M., Nihei, N., Saito, N., Sasaki, T., Kurihara, T. & Agui, N.: *Ascogregarina* sp. in *Aedes albopictus* in Japan: Effect of the infection on the other aedine mosquitoes. 第 1 回国際 Dengue 熱・Dengue 出血熱会議 (チェンマイ市), 2000 年 11 月 20-24 日

H 知的財産権の出願・登録状況

特に該当するものはない。

図1 我が国の *Ascogregarina* spp. の分布

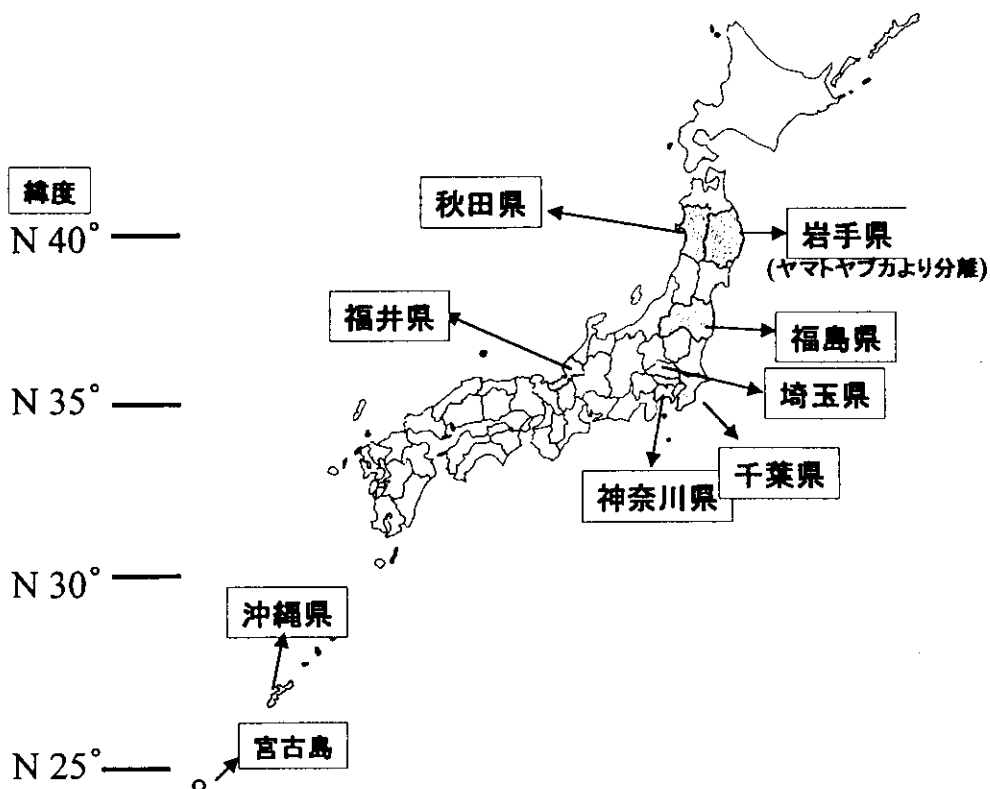


図2 *Ascogregarina* spp. の生活史

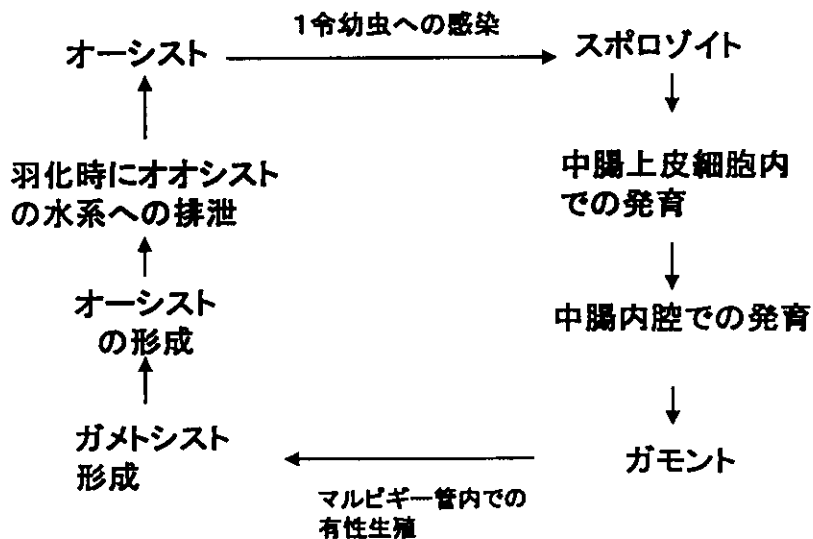
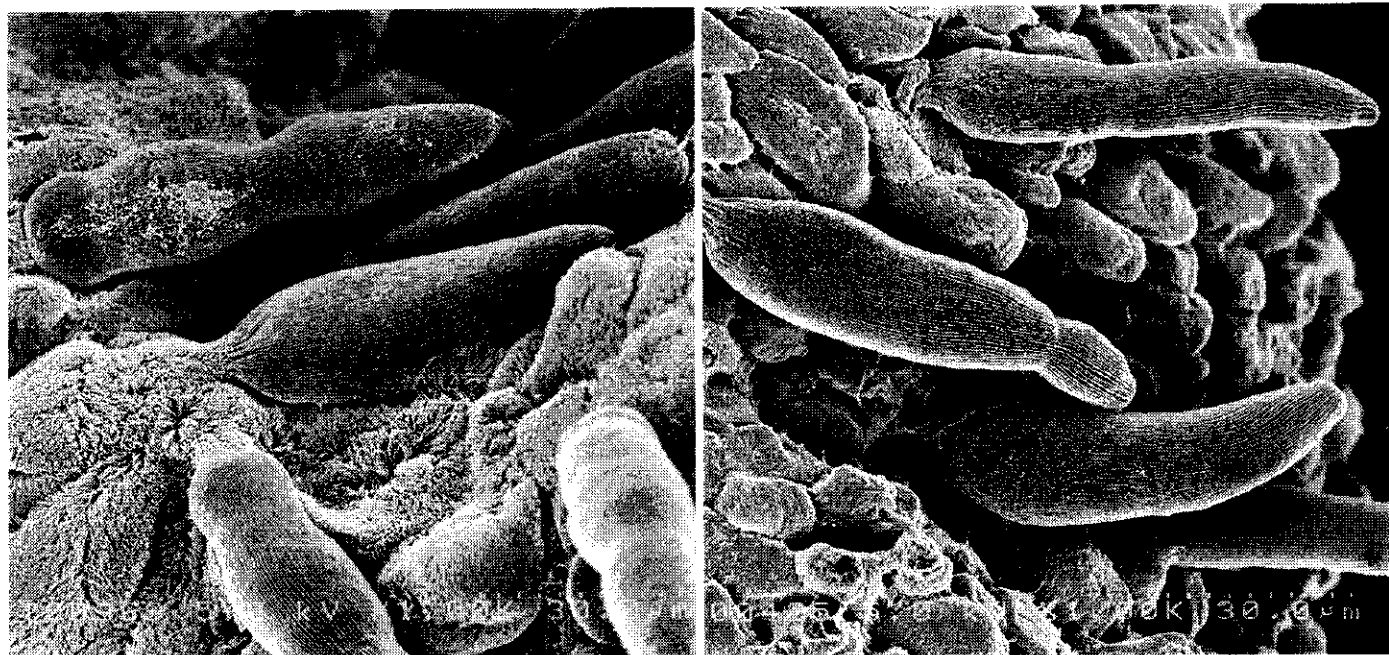


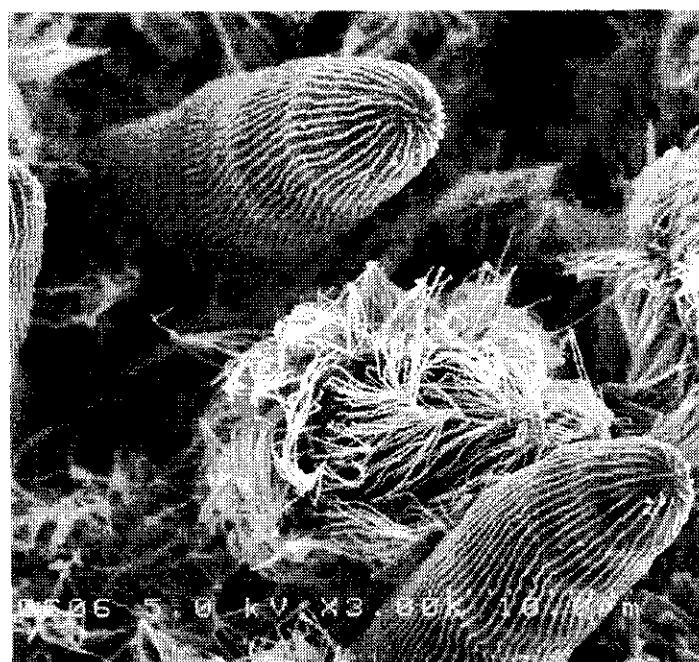
図 3

3種ヤブカ幼虫中腸内における *Ascogregarina* spp. 栄養体



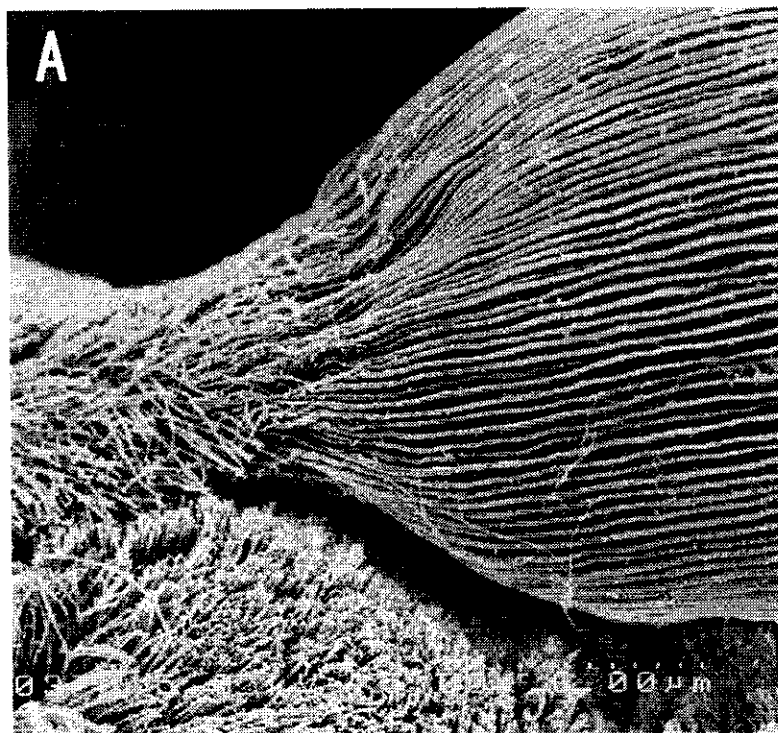
ヒトスジシマカ中腸内

ヤマトヤブカ中腸内

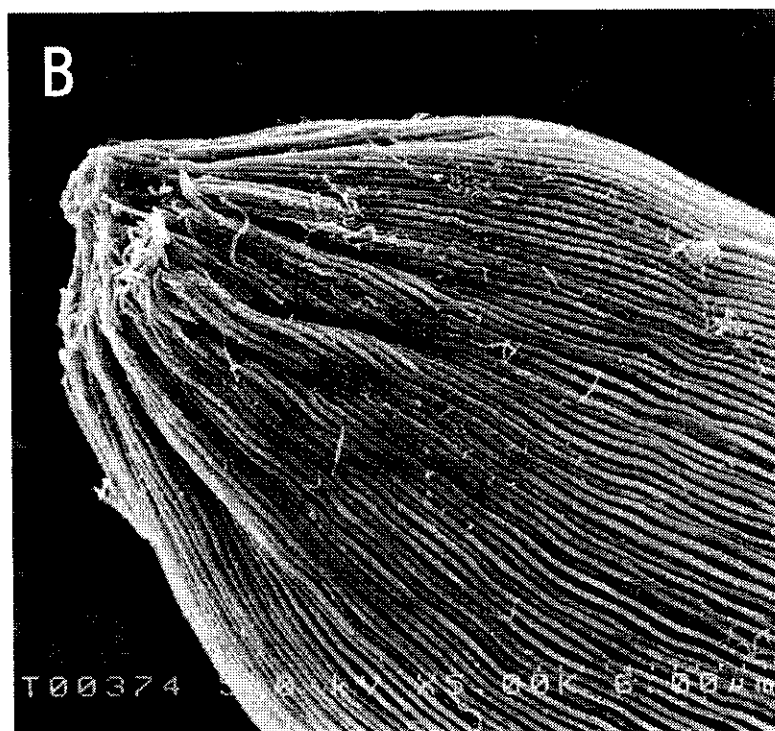


ネッタイシマカ中腸内

図4 ヒトスジシマカ由来の *Ascogregarina* sp.
栄養体の前端部の超微形態



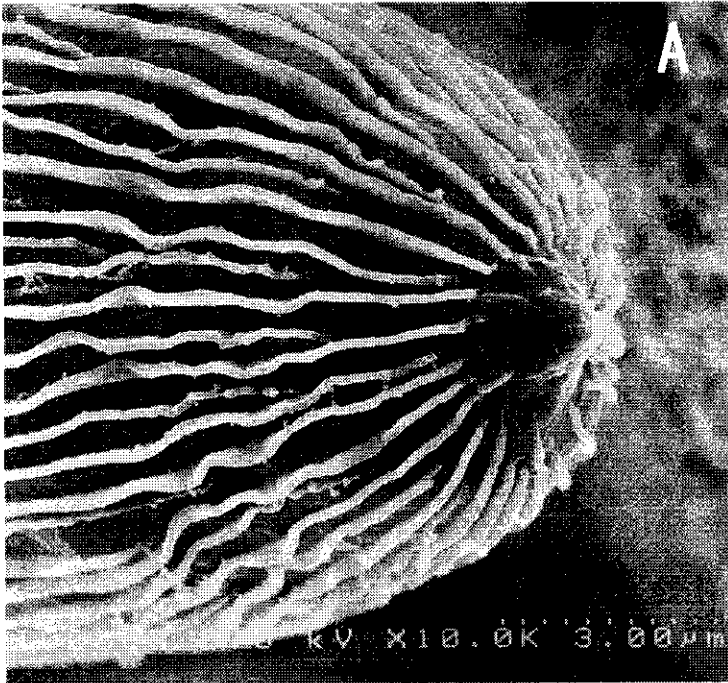
A. ヒトスジヤブカ中腸微絨毛内に前端部を固着させた栄養体



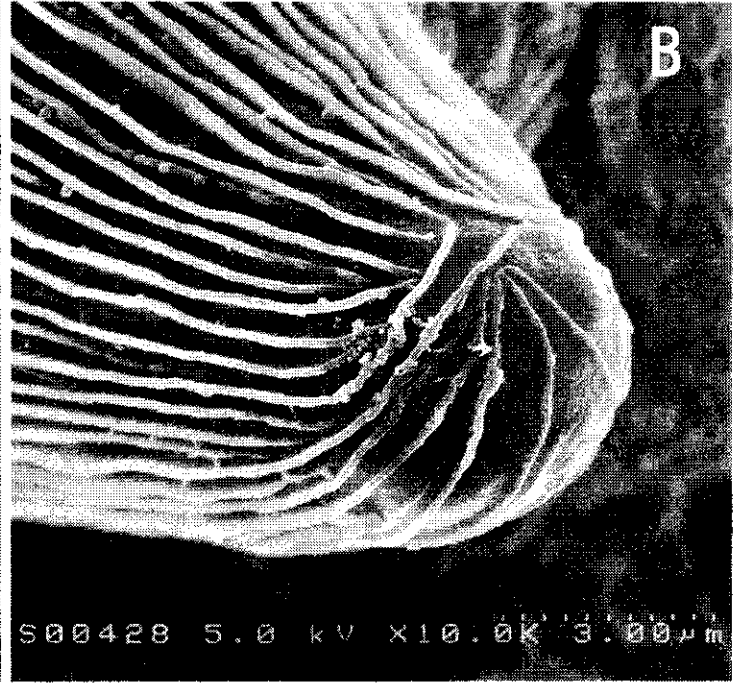
B. *Ascogregarina* sp. 栄養体前端部

図 5

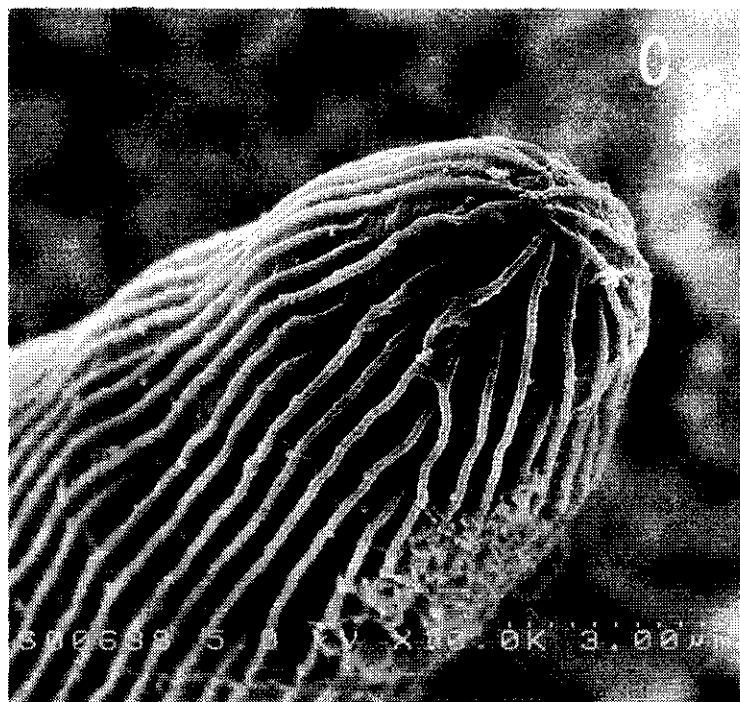
3種ヤブカ由来の *Ascogregarina* spp. 栄養体の後端部
微細構造



ヒトスジシマカ由来



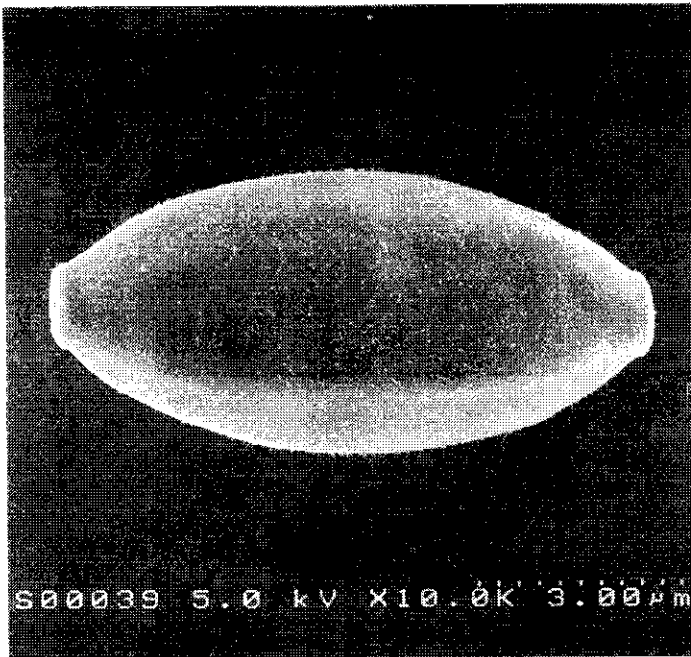
ヤマトヤブカ由来



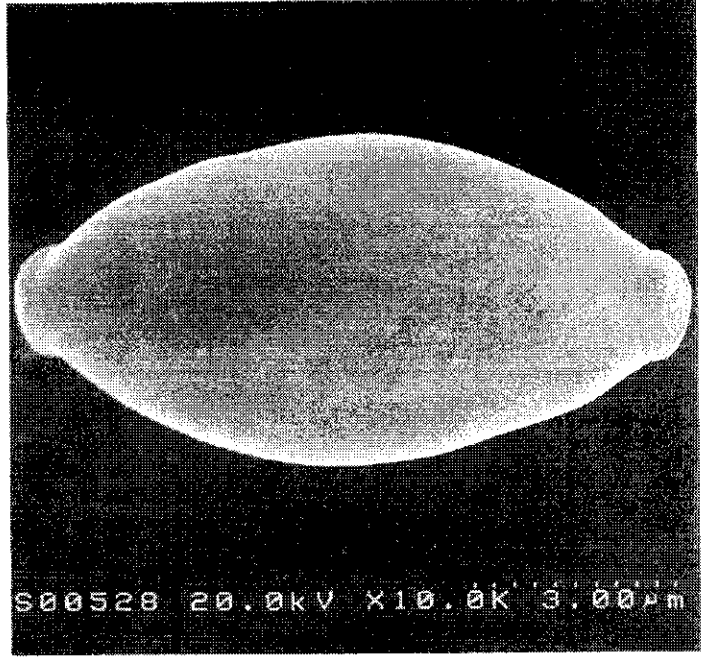
ネッタイシマカ由来

図 6

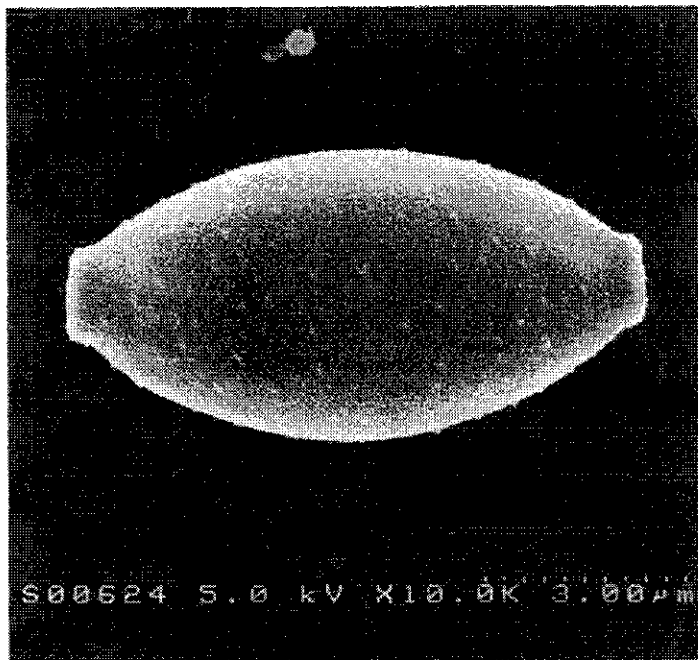
3種ヤブカ由来の *Ascogregarina* spp. オーシストの微細構造



ヒトスジシマカ由来



ヤマトヤブカ由来



ネッタイシマカ由来

表 1 日本およびタイ国産ヤブカ類から分離された
Ascogregarina spp. オーシストのサイズと宿主特異性

原虫の種類	オーシスト (長径×短径)	宿主
<i>Asc. taiwanensis</i> (?)	9.89 × 4.85 μm	<i>Aedes albopictus</i>
<i>Asc. culicis</i> (?)	8.86 × 4.3 μm	<i>Aedes aegypti</i>
<i>Ascogregarina</i> sp.	10.66 × 5.15 μm	<i>Aedes j. japonicus</i>

表 2 *Ascogregarina* spp. の数種蚊への実験感染

原虫 蚊の種類	<i>Ascogregarina</i> sp. (ヒトスジシマカ由来)			<i>Ascogregarina</i> sp. (ヤマトヤブカ由来)		
	TR	GA	OO	TR	GA	OO
<i>Aedes albopictus</i>	+	+	+	+	±	±
<i>Aedes aegypti</i>	+	-	-	+	-	-
<i>Armigeres subalbatus</i>	+	-	-	-	-	-
<i>Anopheles stephensi</i>	-	-	-	-	-	-

TG: 栄養体 GA: ガメシスト OO: オーシスト +: 発育 ±: 少数確認 -: 未発育

研究成果の刊行に関する一覧表

著者名	論文タイトル名	発表誌名	巻数	ページ	出版年
二瓶直子、小林 睦生	地理情報システムを利用し た感染症分布の解析	感染症	30	1-12	2000
小林睦生	感染症媒介動物—とくに昆 虫の研究の現状	総合臨床	50	341-432	2001
Nihei, N. & Kobayashi, M.	The probable expansion of malaria infested areas in East and Southeast Asia as a result of global warming	国際保健医療	15	3-13	2000
Sasaki, T., Kobayashi, M., Agui, N.	Epidemiological potential of excretion and regurgitation by <i>Musca domestica</i> in the dissemination of <i>Escherichia coli</i> O157:H7 to food	J. Med. Entomol.	37	945-949	2000

分担研究報告書

新しい日本脳炎ワクチンの開発：

日本脳炎ウイルス抗原の鼻腔粘膜接種に関する研究

分担研究者

只野昌之（琉球大学医学部ウイルス学講座）

共同研究者

新川 武（琉球大学医学部寄生虫学講座）

加根村和美、馬 紹平（琉球大学医学部ウイルス学講座）

要旨

我が国で用いられている日本脳炎(JE)ワクチンは感染マウス脳乳剤から精製された不活化ワクチンで、皮下注射により接種される。JE ウイルスの伝播経路から考えて、ワクチンを粘膜から接種するという発想はない。しかし、鼻腔等から粘膜免疫できれば、注射器が不要となり接種経費を下げるのが期待される。最近、我々は高濃度 JE ワクチンのマウス鼻腔内接種で血液中に抗体が誘導されることを見出した。続いて、抗体産生に必要な抗原量と接種回数、粘膜免疫アジュバントの必要性について検討したところ、(1)JE ワクチンのマウス鼻腔内接種では、抗体産生を誘導するのに必要な抗原量は 1 回に最低 400ng の抗原量と計 3 回の接種が必要であった。(2)また、蛋白量で 4,825ng のワクチンをマウスの鼻腔内に 4 回接種した場合には、液性免疫誘導に粘膜免疫アジュバントを必要としなかったが、1,200ng 以下の抗原量では必要であった。

A. 研究の背景と目的

日本脳炎(Japanese encephalitis: JE)は死亡率が高く、回復後も後遺症が高率に残ることから、流行地では深刻な問

題となっている。本症の起因ウイルスは JE ウイルス(JEV)で、蚊の吸血によって伝播する。JEV は多くの脊椎動物に感染するが、ブタが増幅動物として重要な役

割を演じており、ヒトは終末宿主と考えられている。また、JEV の主な媒介蚊であるコガタアカイエカは温帯から熱帯までの広い地域に生息し、主に水田で発生する。したがって、米と豚肉を食材とする食文化と JE の間には密接なつながりがあると思われる。事実、本症は東アジアから東南アジアを経て南アジアに至る米食文化圏で多発し、最近ではオーストラリアにも上陸し、分布は拡大する傾向にある。流行地が発展途上国なので正確な数字は把握されていないが、少なくとも年間 50,000 人の患者が発生し、その内 10,000 人以上が死の転帰をとっていると WHO は推定している。ヒトにおける JEV 感染のほとんどが不顕性であることを勘合すると、流行地では毎年数千万人が JEV に感染して JE のリスクに曝されていることになり、他の感染症と同様に何らかの対策が必要と思われる。流行地のほとんどが困窮にあえぐ途上国であることから、特に JE 対策に経験を持つわが国のような先進国が手助けをするのは責務である。

現在、本症に対する特効薬はなく、ワクチンと媒介蚊コントロールが JE 対策の両輪として考えられている。かつて、わが国でも毎年多数の JE 患者が発生していたが、最近では数えるほどに激減してしまい、過去の感染症になりつつある。わが国で JE が激減した理由として、ワクチンの普及と住民が媒介蚊に刺されなくなったことが考えられているが、後者

に関しては網戸の普及、家屋の隙間が少なくなった、あるいは周囲に蚊の繁殖場所が少なくなった等、住環境が整備されたことが大きく寄与していると思われる。途上国で住環境をわが国のように整備することは現実的とはいえない。また、途上国の Dengue やマラリアの対策で実施されている媒介蚊コントロールが JE の対策にどれだけ有効かは不明である。したがって、途上国における日本脳炎対策にはワクチンを普及させて住民の免疫レベルを高めることが、現時点での効果的方策であると思われる。現行の日本脳炎ワクチンには、わが国が開発した不活化ワクチンと中国が開発した生ワクチンがある。前者は効果と安全性において優れているが、後者は価格面で優れている（安価）と思われる。何れにしても、両者とも運搬や接種にかかる経費はかわらないと思われ、現行 JE ワクチンを発展途上国で普及させるには先進国の絶大な経済支援が必要であるが、接種にかかる経費を節減できれば、その負担を多少なりとも減らすことができるだろう。最近、我々はマウスへの現行 JE ワクチンの鼻腔内接種で血液中の JE 抗体産生を誘導できることを見出した。もし、JE ワクチン接種に注射器が必要無ければ、接種経費が相当削減でき、接種も簡便化できることが期待される。本研究では現行 JE ワクチンのマウス鼻腔接種で血中抗体を誘導するのに必要な抗原量と接種回数と粘膜免疫アジュバントの必要性を検討した。

B. 研究方法

1. マウス免疫

4週齢の ddy マウス(メス)を用いた。濃縮日本脳炎ワクチン(北京株; 蛋白濃度:96.5ug/ml)は財団法人阪大微生物病研究会より分与を受けた。蛋白量で1200、400、134、45、15ng/25ul になるようにワクチンを希釈し、各濃度のワクチンを鼻腔に25ul ずつ1週間毎、計4回接種した(1群4匹)。免疫の際に粘膜免疫アジュバントとしてコレラトキシン(10ug/マウス/免疫)を用いた。各接種の1週間後に尾部からろ紙法により採血し、抗体測定に供した。

2. 抗体測定

免疫に用いたワクチンを固相抗原(24ng/ウエル)とする間接 IgG-ELISA と96穴プレートを用いた50%フォーカス減少法による中和試験の両方で抗体を測定した。

C. 研究結果

種々の抗原量の日本脳炎ワクチンを粘膜アジュバント存在、非存在の条件でマウスの鼻腔内に接種し、液性の免疫応答を検討した。表に示したように、アジュバント存在下で鼻腔内接種したマウスグループでは4回の免疫の後、血液中に抗体がELISA および中和試験のいずれの方法でも高率に検出されたが、134ng 以下のワクチン量ではたとえアジュバントを用いても抗体産生はほとんど誘導されなかった。また、アジュバント

を用いないで鼻腔内接種したマウスでは1回の接種に用いたワクチン抗原が1,200ng 以下ではほとんど抗体が産生されなかったが、1回あたり4,800ng の抗原量ではアジュバントを用いなくても5匹中3匹(60%)のマウスで液性免疫応答が認められた。(data not shown)

次に、4回の免疫の後にELISA と中和試験の両方で抗体産生が高率に誘導されたグループFとGのマウスから各免疫の度に採血された全ての血清サンプルについてELISA で抗体を測定した。図にグループFとGの各々のマウスの抗体価の推移を示した。殆どのマウスで3回の接種の後に液性免疫の応答が認められた。

D. 考察

試験的研究ではあるが、皮下への注射で用いられる現行の不活化JEワクチンが鼻腔内に接種することでも血中の抗体を誘導できることがマウスを用いた実験でわかった。また、鼻腔粘膜で誘導される抗体はELISA のみならず中和試験でも検出されたことから鼻腔接種でも感染防御免疫を誘導できることが示唆された。結果には示さなかったが、JEワクチンを鼻腔内接種してJE抗体が誘導された2つのグループ(表のグループF、G)は致死量のJEウイルスを接種しても、腹腔内接種グループ同様、全てのマウスが生残した。

本研究で用いられたJEワクチン

は蛋白量で約 127ng をマウスの腹腔に 2 回接種すれば、感染防御に十分な中和抗体を誘導できることがワクチン検定で既に知られている。しかし、鼻腔内接種法で血中抗体を誘導するには蛋白量で 400ng のワクチンを 3 回以上接種する必要があった。鼻腔内接種法は腹腔内接種法に比べて血中 JE 抗体を誘導するのに必要な抗原量と接種回数の両方で劣っていたが、接種に注射器が必要ないので接種経費と簡便性において有利であると思われる。また、鼻腔接種に使用するワクチンは注射するワクチンと比べて純度や無菌性において基準を低くして製造コストを下げるができるかも知れない。さらに、注射しないで免疫できることから副作用などのリスクを軽減することが期待される。

E. 結論

マウスを用いた実験で、現行 JE ワクチンの鼻腔内接種で血中抗体を誘導するには蛋白量で 400ng 以上、免疫回数で 3 回以上の接種が必要で、粘膜アジュバントを併用する必要があった。免疫の効率で腹腔内接種法より劣るが、接種に注射器を必要としないので、接種経費を節減し、接種をより簡便にすることが期待できる。また、注射しないので安全性の面で有利かも知れない。

F. 研究発表

1. 論文発表

Arakawa T., Yu J., and Lrangridge W.H.R. Synthesis of a Cholera Toxin B Subunit-rotavirus NSP4 Fusion Protein in Potato. *Plant Cell Report*, in press.

Yu J., Arakawa T., Chong D., and Lrangridge WHR. Assembly of Cholera Toxin-Antigen Fusion Protein In Transgenic Potato. *Transgenics Vol.40(3-4)*, pp1-10, 2000

新川武、只野昌之、佐藤良也 食べるワクチン *BIO Clinica Vol.15(8)*, pp32-37, (2000)

新川武、佐藤良也：植物にワクチンを作らせる (Plant-based vaccines) *Bioscience & Industry Vol.58(6)*, pp35-36, (2000)

新川武、只野昌之、馬紹平、當眞弘、佐藤茂俊、岸本亜耶乃、長嶺勝、根岸勉、佐藤良也 植物を用いた新しいワクチン生産システム確立への挑戦 南方資源利用技術研究会誌 *Vol.16(1)*, pp11-18, 2000

2. 学会発表

只野昌之、新川武、加根村和美、馬紹平、倉根一郎、福永利彦：日本脳炎ウイルス抗原のマウス鼻腔接種における液性免疫応答。第 48 回に本ウイルス学会学術集会・総会(2000)

只野昌之、新川武、馬紹平、加根村和美、當眞弘、岸本亜耶乃、松本安喜、佐藤茂俊、倉根一郎、佐藤良也、福永利彦：日本脳炎ウイルス E 蛋白 /CTB サブユニット融合蛋白の発現

と経粘膜免疫の試み。第 41 回日本熱帯医学会大会 (2001)

只野昌之：経粘膜ワクチンによる日本脳炎予防対策。第 25 回日本熱帯医学会九州支部会、シンポジウム (2001)

新川武：熱帯感染症対策の新ワクチン戦略。第 25 回日本熱帯医学会九州支部会、シンポジウム (2001)

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許

「不活化日本脳炎ウイルスおよびウイルス由来組換えタンパク質の経粘膜投与方法による全身性免疫応答の誘導ならびに感染防御効果」という名称で申請を準備中。

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

表1. マウス経鼻接種で抗体産性に要するワクチン量と粘膜免疫アジュバントの必要性

	Mouse Groups									
	JE-vac ^{a)}					JE-vac+CT				
	A (1,200) ^{b)}	B (400)	C (134)	D (44.7)	E (14.9)	F (1,200)	G (400)	H (134)	I (44.7)	J (14.9)
IgG-ELISA	0/4 ^{c)}	0/4	0/4	0/4	0/4	4/4	3/4	0/4	0/4	0/4
N-test	0/4	1/4	0/4	0/4	0/4	4/4	4/4	1/4	1/4	0/4

a)接種ワクチン；JE-vac：現行ワクチン単独、JE-vac+CT：現行ワクチンとアジュバント、

b)1回に接種したワクチン量(蛋白量: ng)、^{c)}4回接種後の抗体陽性率(陽性数/実施数)

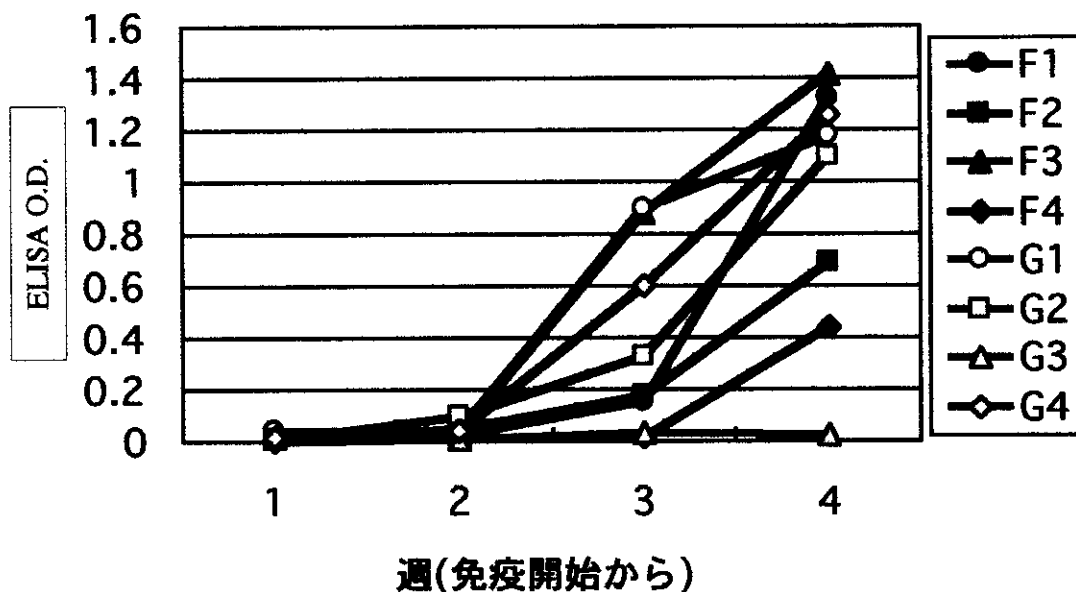


図1. 現行JEワクチンのマウス鼻腔内接種による血中IgG抗体の推移

リポソームによる日本脳炎DNAワクチンの免疫誘導促進

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 網代直子（神戸大学医学部医療基礎学講座）
奴久妻智代子（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）の前駆膜（prM）及び外被膜（E）遺伝子を組み込んだプラスミドはマウスに防御をもたらす有望な候補DNAワクチンであることをすでに報告した。しかし、一般的にDNAワクチンにより誘導される中和抗体は比較的低いレベルであり、JEVの場合にも該当した。今回、米国V社が開発中の2種のリポソーム試薬を用いてマウスにおける免疫誘導効果を調べた。その結果、筋肉内に2週間隔で3回投与した系において、10ugのDNAワクチンの誘導する中和抗体はDNA単独では検出されなかった（<1:10）が、リポソームと調合して投与した群では1:80以上に上昇した。また、経鼻接種の系において、20ugのDNAを単独で8回投与した群には攻撃に対する防御は認められなかったが、リポソームと共に投与した群では部分防御が認められた。以上の結果は、リポソームがDNAワクチンの免疫誘導能を増強する効果をもつことを示す。

A. 研究目的

日本脳炎は東南アジア、南アジアを中心に分布し、年間1万人の患者を生ずる。国際的に認められているワクチンは、感染マウス脳から製造される不活化ワクチンであるが、高価なため流行国に普及が困難である。DNAワクチンは、病原性ウイルス遺伝子の一部を宿主に導入して防御免疫を誘導する型のワクチンであり、安全で安価に製造できるため、不活化ワクチンに代わり得るワクチン候補の1つである。

我々は、日本脳炎ウイルス（JEV）の前駆膜（prM）及び外被膜（E）遺伝子を組み込んだプラスミド（pcJEME）を作製し、マウスに防御をもたらすことを報告してきた（Konishi et al., *Journal of Virology* 72, 4925-4930, 1998）。しかし、日本脳炎に対する防御免疫に最も重要とされる中和抗体の誘導レベルは低く、現行の不活化ワクチンに匹敵する中和抗体をマウスに誘導するためには、多くのドーズを必要とした。

本研究では、DNAワクチンの免疫誘導能を増強する試薬であるリポソームの効果を調べた。米国V社が開発中の2種のリポソーム試薬をpcJEMEと共にマウスに接種して、誘導される中和抗体や防御免疫について、pcJEME単独接種のマウスと比較した。

B. 研究方法

プラスミド：pcJEMEは、市販のpcDNA3ベクターに、JEVのprM及びE遺伝子を組込んだものである。詳細は平成9年度「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」研究班の分担研究報告書『日本脳炎DNAワクチンの作製』に記載した。

リポソーム：米国V社より、2種のリポソーム試薬（リポソームAとリポソームBとする）の分与を受けた。他のウイルスを用いた予備実験において、リポソームAは筋肉内投与の系で、またリポソームBは経鼻接種の系で中和抗体誘導能の増強が認めら

れている。V社の設定したプロトコールにより、DNAとリポソームを調合して、免疫原とした。

マウスの免疫：4週令の雄BALB/cマウスを用いた。筋肉内投与の系では、100ugあるいは10ugのDNAを2週間隔で3回、大腿四頭筋に投与した。また、経鼻接種の系では、20ugのDNAを1週から3週間隔で8回、鼻腔に投与した。経眼接種では、4ugのDNAを1週から3週間隔で8回、眼球の上に滴下した。接種液量は、筋肉内接種では100ul、経鼻接種では20ul、経眼接種では4ulであった。

免疫マウスへの攻撃：経鼻接種あるいは経眼接種したマウスについて、100 LD₅₀のJEV 北京3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。

(倫理面への配慮)

本研究の動物実験は、神戸大学医学部動物実験委員会の許可を得て行った。

C. 研究結果

中和抗体誘導能増強効果：100ugあるいは10ugのDNAをリポソームAと共に3回筋肉内投与したマウスから、それぞれの免疫から2週間後に採血して、中和抗体価を求めた(表1)。pcJEMEを10ug接種した群において、2回の免疫では中和抗体の誘導は認められなかったが、3回免疫後に1:80以上の中和抗体価が認められた。pcJEME単独による3回免疫では、検出できる中和抗体が誘導されていないことから、リポソームAの中和抗体誘導能増強効果が示された。しかし、100ug接種群では、pcJEME単独投与により誘導された中和抗体価がリポソームAと共に投与した群より高かった。これは、DNAをリポソームAと調合する際、この高いDNA濃度では凝集塊が形成され、DNAの細胞への導入効率が低下したためである。V社のプロトコールでは、この濃度がリポソームAと混合できる最大値とされていたが、今回の実験では凝集塊が形成された。

なお、経鼻接種あるいは経眼接種した群においては、中和抗体の誘導は認められなかった(表2)。

防御免疫誘導能増強効果：経鼻接種及び経眼接種したマウスにおいて攻撃実験を行い、リポソームと調合してDNAを免疫した群とDNA単独で免疫した群における生存率を比較した(表2)。経鼻接種群において、pcJEME単独による8回免疫ではすべてのマウスが攻撃により死亡したが、リポソームと共に免疫したマウスでは、40から67%の生存率を示した。この内、リポソームBを用いて得られた67%と対象の0%の間には統計的に有意な差(P<0.05)が認められた。前述のように、リポソームBは経鼻接種における効果がすでに他のウイルスで示されており、本実験でもリポソームAより免疫効果が優れることが示唆された。

一方、経眼接種したマウスにおいては、いずれの群も防御を示さなかった。

D. 考察

以上の結果は、リポソームがDNAワクチンの中和抗体及び防御免疫誘導能を増強する効果をもつことを示す。経鼻接種では8回という多くの免疫回数であるにもかかわらず部分防御にとどまったが、免疫に用いた総DNA量が160ugであることを考えると、評価できる。マウスより大きい動物では、より大量の接種液を用いて、接種回数を減らすことができるかもしれない。注射器の必要な筋肉内接種と比較して、点鼻薬的に投与できる簡便な経鼻接種は、日本脳炎流行国に普及させるために適した投与方法と考えられる。中和抗体が検出されなかったため、今後、pcJEMEの経鼻接種による防御機構を解明する必要がある。

簡便性という観点から、点眼薬的投与方法として今回経眼接種を試みたが、DNAの総投与量が32ugと少なく、効果は認められなかった。

蛋白を宿主に導入する型のワクチンと比較して、遺伝子を宿主に導入する型のワクチンは一般に中和抗体誘導能が低い傾向にある。我々は日本脳炎DNAワクチンだけでなくデングに対しても中和抗体誘導型のDNAワクチンを作製・評価してきたが、誘導される中和抗体レベルは比較的低いものであった。リポソームを利用してDNAの導入効率を高め免疫原性を増強する手法は、日本脳炎やデングに対するDNAワクチンの

さらなる開発に寄与すると考えられる。

E. 結論

マウスにおける日本脳炎DNAワクチンの中和抗体及び防御免疫誘導能を、リボソームが増強した。

F. 健康危険情報

特記すべき事項なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

Konishi E., Kurane I. and Mason P. W.: Immune response to traditional and genetically engineered Japanese encephalitis vaccines. *Recent Research Developments in Virology* 2, 1-21 (2000).

Kanesa-thasan N., Smucny J. J., Hoke C. H., Marks D. H., Konishi E., Kurane I., Tang D. B., Vaughn D. W., Mason P. W. and Shope R. E.: Safety and immunogenicity of NYVAC-JEV and ALVAC-JEV attenuated recombinant Japanese encephalitis virus - poxvirus vaccines in vaccinia-nonimmune and vaccinia-immune humans. *Vaccine* 19, 483-491 (2000).

Konishi E., Fujii A. and Peter W. Mason: Generation and characterization of a mammalian cell line continuously expressing Japanese encephalitis virus subviral particles. *Journal of Virology* 75, 2204-2212 (2001).

2. 学会発表

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. The 34th Joint

Working Conference of the Japan-US Cooperative Medical Science Program Viral Diseases Panel, Inuyama (2000).

Konishi E., Fujii A. and Peter W. Mason: Generation and characterization of a mammalian cell line continuously expressing Japanese encephalitis virus subviral particles. The 34th meeting of the Japan-US Cooperative Medical Science Program Viral Diseases Panel, Inuyama (2000).

網代直子、奴久妻智代子、倉根一郎、小西英二：日本脳炎ウイルスに対する防御CTLエピトープの検索。第48回日本ウイルス学会学術集会・総会（2000）。

小西英二、藤井敦子：日本脳炎ウイルス非構造蛋白NS1の役割－哺乳類細胞と蚊細胞から放出されるウイルス粒子からのアプローチ。第48回日本ウイルス学会学術集会・総会（2000）。

藤井敦子、小西英二：デングウイルス細胞外ウイルス様粒子を産生する細胞クローンの樹立。第48回日本ウイルス学会学術集会・総会（2000）。

Konishi E., Fujii A. and Peter W. Mason: Development of subunit vaccines for Japanese encephalitis and dengue. International Seminar on Emerging and Re-emerging Infectious Diseases, Nagasaki (2000).

Konishi E.: Development of DNA and subunit vaccines for Japanese encephalitis. The 6th International Conference on Emerging Infectious Diseases in the Pacific Rim, Philippines (2001).

表1 pcJEMEの中和抗体誘導能に及ぼすリポソームAの増強効果

免疫原 ^a	ドーズ	リポソーム A ^a	中和抗体価 ^b		
			1回免疫	2回免疫	3回免疫
pcJEME	100 ug	+	<1:10	<1:10	1:10
pcJEME	100 ug	-	<1:10	1:20	1:40
pcJEME	10 ug	+	<1:10	<1:10	≥1:80
pcJEME	10 ug	-	<1:10	<1:10	<1:10
pcDNA3	100 ug	+	<1:10	<1:10	<1:10

^a免疫原は、リポソーム A と調合して (+) または単独で (-) 筋肉内接種により投与した。

^b各免疫の2週間後に採血し、90%ブランク減少法により中和試験を行った。

表2 pcJEME の中和抗体及び防御免疫誘導能に及ぼすリポソームの増強効果

免疫原 ^a	ドーズ	投与経路 ^c	免疫回数 ^b		中和抗体価	生存率 ^d
			A	B		
pcJEME	20 ug	i.n.	8	0	<1:10	40% (2/5)
pcJEME	20 ug	i.n.	3	5	<1:10	67% (4/6) ^e
pcJEME	20 ug	i.n.	0	0	<1:10	0% (0/9) ^e
pcJEME	4 ug	i.o.	8	0	<1:10	0% (0/5)
pcJEME	4 ug	i.o.	3	5	<1:10	0% (0/5)
pcJEME	4 ug	i.o.	0	0	<1:10	10% (1/10)

^aすべての群において、8回の免疫を行った。

^bpcJEME をリポソーム A あるいはリポソーム B と共に免疫した回数。

^c経鼻接種 (i.n.) あるいは経眼接種 (i.o.) による。

^d括弧内は生存数/総数。

^eP<0.05。

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（2）

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 網代直子（神戸大学医学部医療基礎学講座）
奴久妻智代子（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 昨年までに、日本脳炎ウイルス（JEV）のC、E、NS2a及びNS3領域はBALB/cマウスに細胞傷害性Tリンパ球（CTL）を誘導するが、防御を誘導するほど十分な強さでないこと、またprM領域はCTLを誘導しないことを報告してきた。今回は、NS1、NS2b、NS4a、NS4b及びNS5領域について調べた。マウスユビキチン遺伝子が共発現するように設計したベクタープラスミドに、各領域の遺伝子を組み込み作製したプラスミドDNAを免疫原として、100ugのドーズで3回筋肉内投与して免疫したマウスを実験に用いた。脾臓細胞をJEVで刺激しCTL試験した結果、CTLの誘導はNS1、NS2b及びNS5免疫マウスに認められたが、NS4a及びNS4b免疫マウスには認められなかった。また、致死量のJEVで攻撃した結果、いずれのプラスミドで免疫したマウスにも防御が認められなかった。以上の結果は、JEV蛋白をコードするどの領域も今回の免疫条件では防御誘導に十分な強さのCTLをBALB/cマウスに誘導しないことを示す。JEV感染マウスに誘導されたCTLの移入により、またDNAワクチンを用いてCTLを誘導する能動免疫の系で、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いるが、マウス種やウイルス株さらに免疫や攻撃条件に大きく影響されるものと考えられた。

A. 研究目的

日本脳炎の予防に重要な免疫は中和抗体と考えられている。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、ウイルス病の予防には細胞性免疫も重要であることが証明されてきた。日本脳炎においてはマウスを用いた移入実験により細胞傷害性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ワクチン開発のモデルとなり得る点で重要である。

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）の遺伝子が順にコードされている。この内、我々はすでにC、prM、E、NS2a及びNS3領域についてBALB/cマウスを用いて調べ、prM以外の蛋白にCTL誘導能を認めた（Konishi et al., *Journal of Virology* 73, 5527-5534, 1999；平成11年度「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