

開発に関する研究」研究班の分担研究報告書『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』。しかし、いずれの領域も防御能は示さなかった。本研究では、他の領域を対象として、防御CTLエピトープの検索を行った。

B. 研究方法

ユビキチン組込みプラスミドベクター (pUBIQ)：詳細は平成10年度の上記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、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 (pGEM31MA) に、BALB/cマウスのユビキチン遺伝子を組込んだ。ユビキチン遺伝子の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NS1、NS2b、NS4a、NS4b及びNS5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、PCRにより増幅後、pUBIQとライゲートして、それぞれpUJENS1、pUJENS2b、pUJENS4a、pUJENS4b及びpUJENS5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。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。

なお、Eの前半部 (E1) だけを組み込んだpJEE1、またE1及びユビキチン遺伝子を組み込んだpUJEE1については昨年度の報告書に記載した。

プラスミドDNAによるマウスの免疫：4

から8週齢の雄BALB/cマウスに、PBSに希釈した精製DNAを1匹あたり100ugのドーズで筋肉内接種することにより、3回免疫した。

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%ウシ胎児血清及び50uM 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。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、0.1%ウシ血清アルブミン含有RPMI-1640培養液 (RPMI-BSA) で4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NIH-3T3細胞 (高感受性クローン) をRPMI-BSAで1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た乳酸デヒドロゲナーゼ量をCytotoxicity Detection Kit (LDH) (Boehringer 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。

免疫マウスへの攻撃：DNA3回免疫マウスに100あるいは400 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

CTL誘導能：NS1、NS2b、NS4a、NS4b及びNS5のCTL誘導能を調べるために、各グループ2匹のBALB/cマウスを、pUJENS1、pUJENS2b、pUJENS4a、pUJENS4b、

pUJENS5及びベクターコントロールであるpUBIQにより3回免疫し、脾臓細胞をCTL試験に供した(図1)。その結果、NS1、NS2b、及びNS5においてCTL活性を認め、NS4a及びNS4bには検知できるCTL活性は認められなかった。これらの結果から、10種のウイルス蛋白のうちprM、NS4a及びNS4b以外の蛋白にCTL誘導能が存在することが明らかにされた。なお、図1には前回報告したC、NS2aまたはNS3免疫マウスのCTL試験結果も掲げた。

BALB/cマウスのMHCクラスI分子に結合するアミノ酸モチーフから推定されるCTLエピトープの存在部位を図1の下部に示す。これによると、すべての領域にCTLエピトープが存在するが、prM、NS4a及びNS4b領域にはエピトープ数が少ない。今回これらの領域がBALB/cマウスに検知し得るレベルのCTLを誘導しなかったことは、この少ないエピトープ数に関係しているかもしれない。

ユビキチンの効果：平成11年度の報告書に、少数のマウスを用いて行った予備実験の結果を記載した。今回は、グループ当たり6あるいは12匹のマウスを用いて、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た。pUJEE1、pJEE1またはpUBIQによる3回免疫マウスを100または400 LD₅₀のJEV P3株で攻撃し、生存状況を観察した(図2)。100 LD₅₀の攻撃条件において、E1だけを組み込んだpJEE1で免疫したマウスは、ベクター(pUBIQ)で免疫したマウスと類似の生存曲線を示したのに対し、E1及びユビキチン遺伝子を組み込んだpUJEE1免疫マウスには、より高い生存率がみられた(有意差は無し)。しかし、400 LD₅₀で攻撃した場合、ユビキチンの有無に関わらずE1による防御は認められず、むしろE1を組み込んだプラスミド免疫マウスには早期に死亡する傾向がみられた。以上の結果から、E1による防御をユビキチンが促進する傾向がみられたが、この傾向は攻撃ドーズに依存することも明らかにされた。

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。

防御誘導能：prM及びE以外のウイルス蛋白により誘導されたCTLの防御効果を調べるために、各グループ10匹のBALB/cマウスを各ウイルス蛋白組込みプラスミド及びpUBIQにより3回免疫した後に、100 LD₅₀のJEVを接種し、21日間生存状況を観察した。また、CTLを誘導しなかったpUJENS4a、pUJENS4bについても免疫マウスの攻撃実験を行った。図3に示すように、すべての群で防御は認められず、むしろウイルス蛋白で免疫した群は対照のpUBIQ接種群より早期に死ぬ傾向にあった(有意差はなし)。また、CTL誘導能をもつウイルス蛋白と誘導能のないものとで顕著な差は認められなかった。ベクターコントロールであるpUBIQ接種マウスにおいて攻撃後20%の生存が認められたのは、今回用いた攻撃ウイルスのドーズが100 LD₅₀と比較的低かったこと、またpUBIQに含まれるアンピシリン耐性遺伝子のimmunostimulatory sequenceによる非特異的な免疫誘導の結果と考えられる。

D. 考察

今回の実験結果から、prM、NS4a及びNS4b以外のJEV蛋白には検知し得るレベルのCTLを誘導する能力が存在するが、これらのCTLエピトープは、今回の動物実験モデルにおいては、致死量の攻撃から防御する程の、質的・量的に活性の高いCTLを誘導しないことが明らかにされた。DNAワクチンの手法を用いて能動的にCTLを誘導し得る免疫によりマウスに防御をもたらしたこれまでの報告と、今回我々が得た結果を表にまとめた(表1)。それぞれのグループで免疫や攻撃の方法が異なるが、E蛋白に防御免疫エピトープが存在する可能性が高い。

CTL誘導能のあるプラスミドで免疫したマウスには、攻撃後の生存日数が短くなる傾向にあった。これらのCTLエピトープに誘導されたCTLは、JEVの1次増殖場所における感染細胞の破壊により宿主に防御をもたらすと考えられるが、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。今後、免疫方法や攻撃条件の改良が必要と思われる。防御CTLエピトープの同定は、DNA免疫をベースとした日本脳炎CTLワクチンの開発、及び未だ認可ワクチンのないデングワクチンの開発に寄与すると考えられる。

E. 結論

JEV中山株を用いて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、今回用いた実験系においては十分な防御を誘導するエピトープが見出されなかった。

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）。

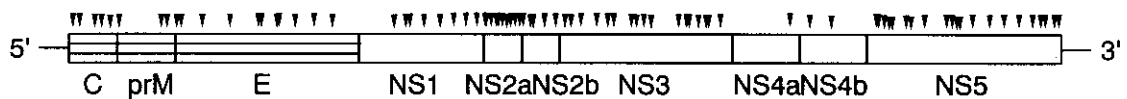
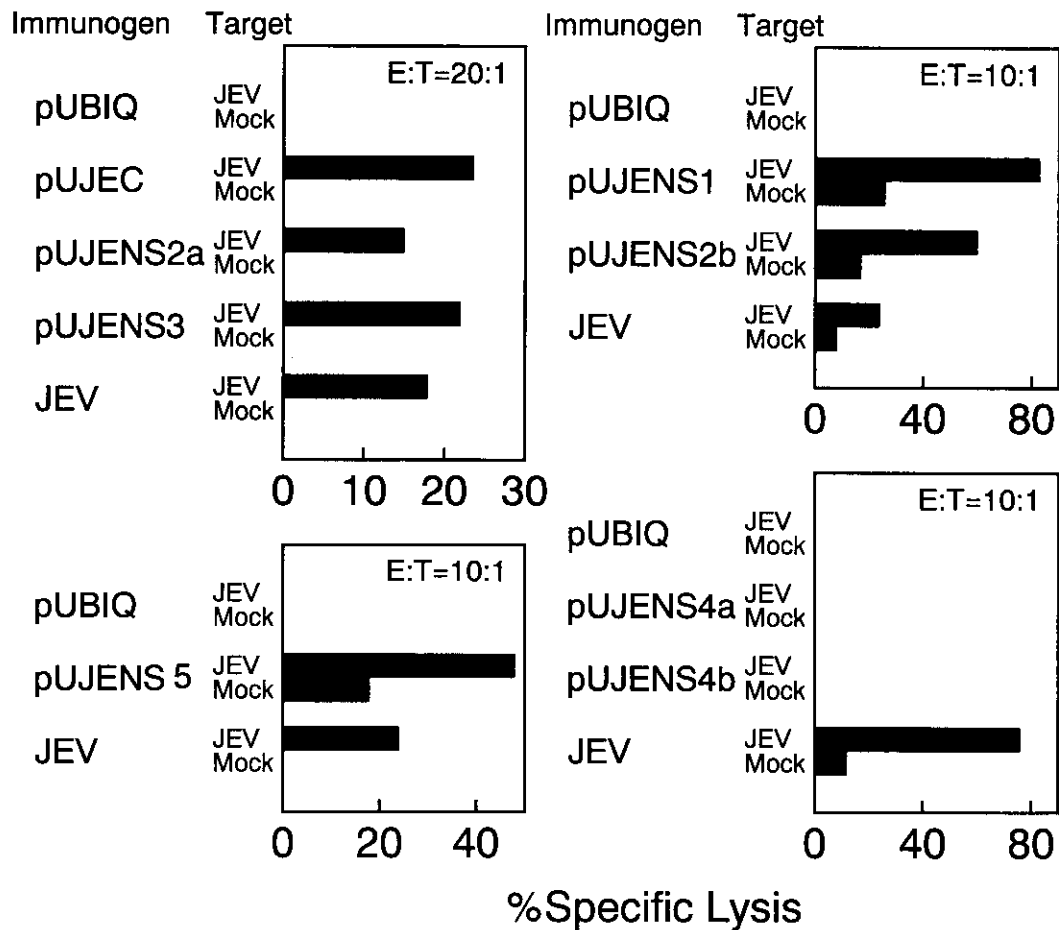
小西英二、藤井敦子：日本脳炎ウイルス非構造蛋白NS1の役割－哺乳類細胞と蚊細胞から放出されるウイルス粒子からのアプローチ。第48回日本ウイルス学会学術集会・総会（2000）。

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).

CTL Activity Induced by Individual JEV Genes



Location of binding motifs

図1. 日本脳炎ウイルス各構造・非構造蛋白がマウスに誘導するCTL活性。
下はBALB/cマウスのMHCクラス1分子に結合するアミノ酸モチーフの存在部位を示す。

SURVIVAL CURVE

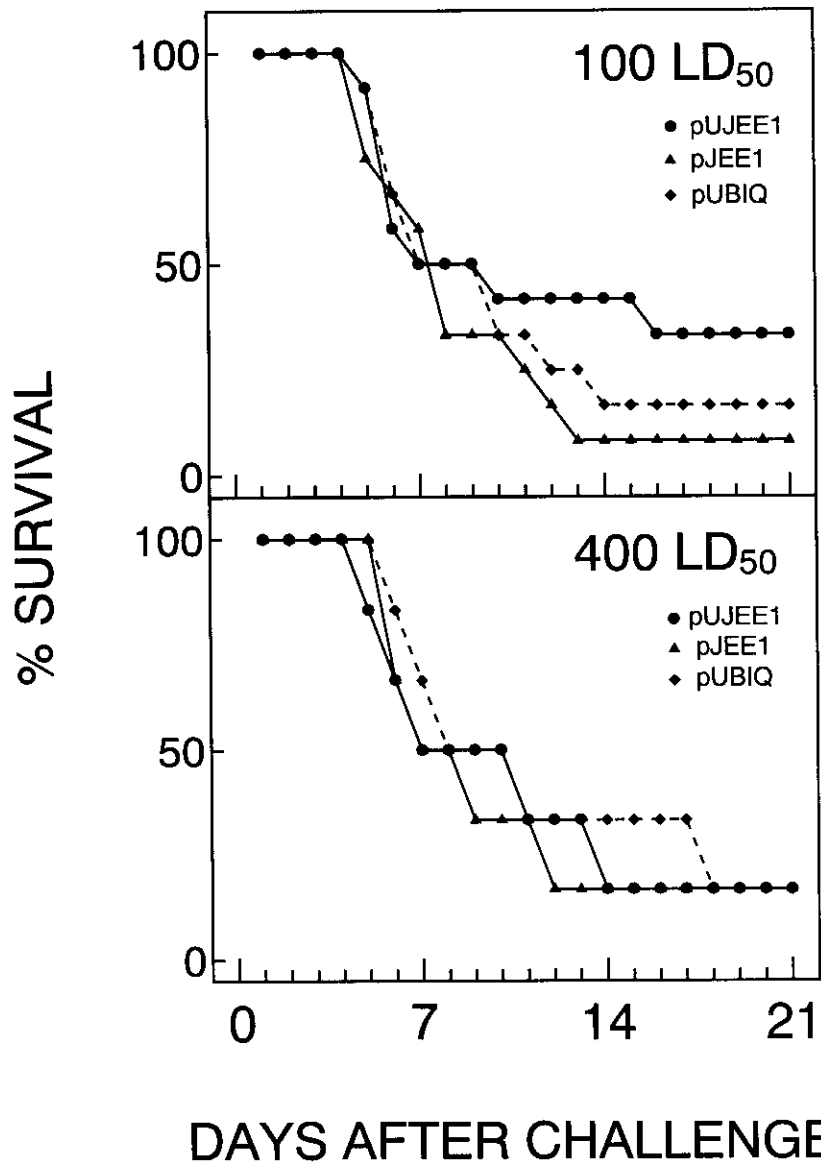


図2 日本脳炎ウイルスE遺伝子の前半部 (E1) を含むプラスミドにより免疫したマウスにおける攻撃後の生存曲線。攻撃には、100 LD₅₀ (上のパネル) と400 LD₅₀ (下のパネル) の北京P3株を用いた。

SURVIVAL CURVE

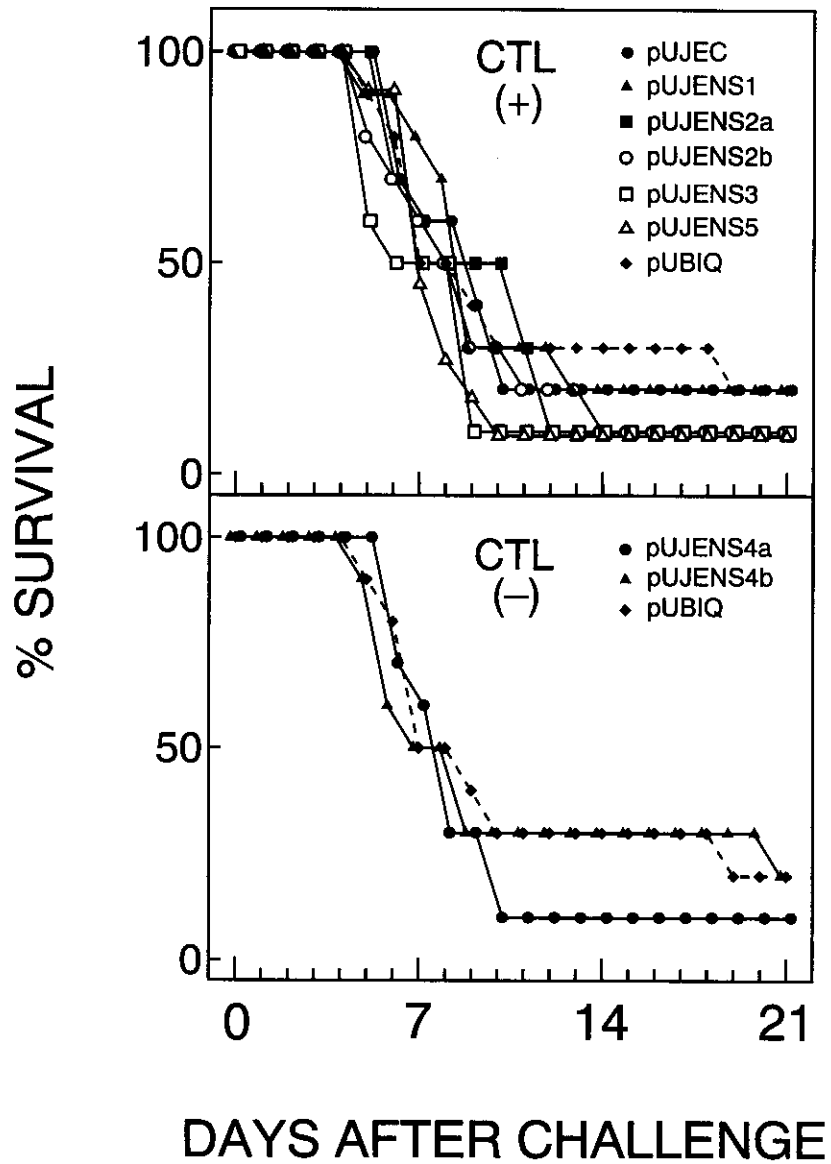


図3 日本脳炎ウイルス各構造・非構造蛋白遺伝子を含むプラスミドにより免疫したマウスにおける攻撃後の生存曲線。CTLを誘導するプラスミド（上のパネル）と誘導しないプラスミド（下のパネル）に分けて示した。

表 1 日本脳炎ウイルス各構造・非構造蛋白遺伝子のマウスにおける防御能に関する他の報告との比較

Coding region	Chen et al. (1999) ^a	Ashok and Rangarajan (2000) ^b	Our present result			
			CTL activity	E1 100 LD ₅₀ ^c	E1 400 LD ₅₀ ^c	C-NS5 except prM, E ^d
C	0		+			20
prM			-			
E	89	51	+	33	17	
NS1	15		+			20
NS2a			+			10
NS2b			+			10
NS3	0		+			10
NS4a			-			10
NS4b			-			20
NS5	0		+			10
Vector	3	0	-	17	17	20

^a Journal of Virology 73,10137-10145

^b Vaccine 18, 68-75

^c 図2の結果

^d 図3の結果

厚生科学研究費補助金(新興・再興感染症研究事業)

分担研究報告書

カニクイザルにおける日本脳炎DNAワクチンの有効性に関する研究

分担研究者 山田章雄 国立感染症研究所
分担研究者 向井鎌三郎 国立感染症研究所
協力研究者 榊原一兵 国立感染症研究所
協力研究者 棚林 清 国立感染症研究所

研究要旨 日本脳炎ウイルス(JEV)に対するDNAワクチンの開発に向け、カニクイザルにおける日本脳炎ウイルス感染のモデルを確立し、更に、マウスで有効性が確認されているワクチン候補プラスミドDNAをカニクイザルに接種し、血清学的に有効性を検討した。DNAワクチン接種により明らかに中和抗体が誘導されたが、今回行なった攻撃実験では感染防御とワクチン接種との明確な関連を示す成績は得られなかった。

A. 研究目的

JEVに対するDNAワクチンの実用化に際しては、ヒトにおける有効性及び安全性が確立されていなければならない。これまでの研究結果からカニクイザルはJEVに感受性であることが確認できたので、今年度はヒトへの実際の応用を視野に入れて作成した試作DNAワクチンの有効性をカニクイザルにおいて明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

試作DNAワクチン

JEVのprM及びE遺伝子をpNGVL4aベクターに挿入して得られたpNJEMEのDNAを精製し、ワクチンとして使用した。コントロールとしてはベクターDNAを用いた。

動物

国立感染症研究所筑波医学実験用霊長類センターで育成された年齢11-20歳のカニクイザル9頭を用いた。

免疫方法

カニクイザル No1,2にはPBSに溶解したベクターDNA300 μ gをNo4,5,8にはpNJEME300 μ gを大腿部筋肉内(im)に投与した。No6,7にはpNJEME3 μ gをジーンガン(バイオラド)を用いて、腹部皮内に投与した。No3,9には参照日本脳炎ワクチンlot189をヒトへの1用量を皮下に接種した。初回免疫の4週後に不活化ワクチン以外は同様に追加免疫を行った。

血清学的試験

血球凝集抑制試験はガチョウ赤血球を用いて常法通り行った。

中和試験は90%プラーク減少法によった。

(倫理面への配慮)

本研究は国立感染症研究所動物実験委員会による審査を受け承認されたものである。

C. 研究結果

1. 血清学的成績

一回目の実験では、参照ワクチンを接種したカニクイザルにおいては良好な抗体産生が認められたが、DNA ワクチン投与群では初回接種、再接種の後も、有意な HI 抗体産生は認められず、中和抗体に関しても有意な上昇は認められなかった。使用したプラスミドDNAを精査したところ、大腸菌由来と思われる配列の挿入変異が認められたため、新たにストックを作成した。同様のスケジュールでカニクイザルを免疫し、抗体の上昇を測定したところ、表に示すように明らかな中和抗体の産生が認められた。

2. 攻撃実験

これらのカニクイザル到北京株を経鼻接種したところ表に示したように2頭のサルが斃死したが、他は生残した。しかし、DNA ワクチン接種と感染防御との関連は明確ではなかった。

D. 考察

日本脳炎ウイルスに対する DNA ワクチンの有効性をサルにおいて明らかにするために、カニクイザルの免疫を行ったところ、明らかな中和抗体の産生が認められた。しかし、この抗体の存在と感染防御に明らかな関連は認められなかった。本研究で用いたカニクイザルの規格が一定でなかったこと(高齢ザルが多い)、産生された中和抗体が経鼻感染の防御には充分でなかった可能性、攻撃ウイルス量の問題などが要因として考えられる。今後は品質の良いカニクイザルを用い、精度の高い実験を行なう予定である。

E. 結論

日本脳炎ウイルスを標的とした新規ワクチンのうち、DNA ワクチン候補について、カニクイザルにおける有効性試験を行ったが、

中和抗体の産生が認められたものの、感染防御に関しては明確な結論を得られなかった。

表

サル No.	接種後の週				攻撃後の	
	6	8	10	11	生	死
1	<	<	<	<		生
2	<	<	<	<		生
4	<	<	<	<		死
5	20	10	160	160		生
8	20	<	10	10		生
6	20	<	10	10		生
7	40	<	10	10		死
3	10	10	10	160		生
9	320	320	160	160		生

サル 1,2 はベクター 300 μ g を im

サル 4,5,8 は DNA ワクチン 300 μ g を im、サル 6,7 は DNA ワクチン 3 μ g を遺伝子銃で id、サル 3,9 は現行ワクチンを sc。10,11 週の抗体は高感度の PAP 法で検出した。

F. 研究発表

論文発表

山田章雄: ムンプスのヒトにおける病理と動物モデル、臨床とウイルス 26, 13-15, 1998

棚林 清、向井鏖三郎、山田章雄: B ウイルス病とは何か、検査と技術、27, 1551-1552, 1999

Uda, A., Tanabayashi, K., Mukai, R., Yachi, M., Nam, K. H., and Yamada, A. (2001): CD3 polymorphism in cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*). *J. Med. Primatol.* (in press)

Takano, J., Narita, T., Fujimoto, K., Mukai, R., and Yamada, A. (2001): Detection of B virus infection by the enzyme-linked immunoassay using simian agent 8 as antigen. *Exp. Anim.* (in press).

Tanabayashi, K., Mukai, R., and Yamada, A. (2001): Detection of B virus antibody in monkey sera using glycoprotein D expressed in mammalian cells. (submitted)

G. 知的所有権の取得状況
特になし

研究成果の刊行に関する一覧表

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
山田章雄	ムンプスのヒトにおける病理と動物モデル	臨床とウイルス	26	13-15	1998
棚林 清、 向井隼三郎、 山田章雄	B ウイルス病とは何か	検査と技術	27	1551- 1552	1999
Uda A., Tanabayashi K., Mukai, R., Yachi, M., Nam, K.H., and Yamada, A.	CD3 polymorphism in cynomolgus monkeys (<i>Macaca fascicularis</i>).	J. Med. Primatol	in press		2001
Takano, J., Narita, T., Fujimoto, K., Mukai, R., and Yamada, A.	Detection of B virus infection by the enzyme-linked immunoassay using simian agent 8 as antigen.	Exp. Anim.	in press		2001
Tanabayashi, K., Mukai, R., and Yamada, A.	Detection of B virus antibody in monkey sera using glycoprotein D expressed in mammalian cells.		投稿中		2001

分担研究報告書

デング DNA ワクチンの開発：マウスにおける脳内攻撃実験

分担研究者 山岡政興(兵庫県立衛生研究所)
共同研究者 高崎智彦(国立感染症研究所)
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 ベクターpcDNA3 に、デング (DEN) ウイルス 2 型ニューギニア C 株の前駆膜 (prM) シグナル/prM/外被膜 (E) 遺伝子カセット、非構造タンパク NS3 及び NS5 遺伝子をそれぞれ組込んだプラスミド pcD2ME、pcD2NS3 及び pcD2NS5 のマウスにおける免疫誘導能と防御効果について検討した。5 週令の雌 Balb/c マウスを使用し各プラスミドについて 100ug/回を単独で、あるいは pcD2ME と他の 2 種類のプラスミドを組合わせた合計 9 グループについて 2 週間隔で 3 回筋肉接種して免疫した。それぞれのグループにおける免疫誘導能と感染防御効果を、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 株で脳内接種によって攻撃し、検討した。その結果、攻撃前のマウス血清中にプラスミドの発現した抗体の誘導は確認出来た。しかし、明確な防御効果を見ることは出来なかった。

A. 研究目的

デングウイルス感染症は世界の熱帯、亜熱帯地域のほぼ全域に広く分布する蚊媒介性の疾患で、流行地域の拡大と患者の増加が懸念される重要な感染症である。わが国での感染例はないが海外の流行地で感染し入国あるいは帰国後発症するいわゆる輸入感染症として存在し、感染症新法のもと

で全数届出が必要な 4 類感染症に加えられている。これに対して、現在実用になっているデングワクチンはない。

病原体の遺伝子そのものを宿主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/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）のシグナル/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（平成 10 年度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」）。

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、デングウイルス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る。そこでデングウイルスの NS3 遺伝子を組み込みプラスミド pcD2NS3（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」）でマウスを免疫し、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た。その結果、pcD2NS3 はマウスにおいて免疫原性を示した。しかし、マウスに明確な防御免疫を誘導できなかった（平成 11 年度研究班分担研究報告書「デング DNA ワクチンの開発：NS3 遺伝子組み込み DNA ワクチンのマウスにおける免疫原性」）。

前者の pcD2ME マウスモデルでは末梢からの感染を想定し NGC 株を腹腔内接種することにより攻撃し、攻撃後の血中の中和抗体の誘導からワクチンの評価を行なった。しかし、攻撃後病気になるいは生死で判断できる実験系がワクチンの評価としては明確で有用であるが、現在までのところ腹腔内接種でマウスに病気を引き起こすデングウイルスは存在しない。そこで後者の pcD2NS3 のマウスモデルでは脳内接種で攻撃し、ワクチンの評価を試みた。

一方、我々は予備的実験ではあるが、NS3 タンパク単独ではマウスを救えないことおよび、すでに行なった同じフラビウイルスに属する JEV の DNA ワクチンの一連の研究から、デングウイルス感染症においても主体として働くタンパクは prM/E であり、非構造タンパクの NS は補助的に機能するのではないかと推測している。

今回、上記 2 種類のデングウイルス遺伝子組み込みプラスミド（pcD2ME および pcD2NS3）と NS5 遺伝子約 2700bp を組み込んだ pcD2NS5（平成 11 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 NS5 遺伝子組み込み DNA ワクチンの作製」）を用いて、マウスを免疫し、脳内接種によって各々のプラスミドのワクチンとしての評価および様々な組合せで免疫後に誘導される抗体および脳内攻撃に対する防御効果を調べることを目的とした。

B. 研究方法

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。

プラスミド:すでに作製済みの3種類のプラスミドを使用した。1) pcD2ME; デング2型ウイルス NGC 株からクローン化した cDNA を鋳型にして2種類のプライマーを用いて PCR を行ない、シグナル/prM/E 遺伝子を増幅した。2種類のプライマーのうちセンスプライマーは、Eco RV サイト、eukaryotic initiation site (ACC)、開始コドン (ATG) 及び prM シグナル配列の6コドンを含み、アンチセンスプライマーはEのC末端の6コドンに続いて停止コドン (TAG) 及び Xho I サイトを含むように設定した。増幅された遺伝子を、市販の pcDNA3 ベクター (Invitrogen) の Eco RV/Xho I サイトに挿入して pcD2ME を作製した。2) pcD2NS3; すでにクローン化されている NGC 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 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) pcD2NS5; PCR による NS5 遺伝子 DNA の増幅のために、クローン化されている NGC 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。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。

作製法の詳細は平成10年度及び11年度の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」、「デングウイルス非構造タンパク NS3 遺伝子組込み DNA ワクチンの作製」および「デングウイルス非構造タンパク NS5 遺伝子組込み DNA ワクチンの作製」に詳述した。

作製したプラスミド DNA は、Qiagen を用いて精製し、1% アガロースゲル電気泳動で泳動位置を確認し、分光光度計を用いた吸光度測定により定量した。

マウスの免疫: 雌 Balb/c マウスを9グループに分け、グループあたり5匹ずつ用いた。免疫原のプラスミドは、デングウイルス遺伝子を組込んだ pcD2ME、pcD2NS3、pcD2NS5 あるいは pcDNA3 ベクターで、それぞれ1回 100 ug を用いた。免疫原はプラスミド単独で投与するものと、感染防御に主体的に働くと考えられる pcD2ME と pcD2NS3 及び pcD2NS5 を組合せて接種した。これらの免疫原および PBS を5週令マウスの尾根部に2週間隔で3回筋肉内接種した。また、 9×10^6 PFU/one shot の NGC 株を3回マウス腹腔内に接種した。攻撃実験の前に眼窩静脈叢より採血し、血清を分離した。NGC 株及びプラスミドを接種したマウスは個体別に採血し、PBS 接種マウスはグループごとプールした後、試験に用いた。

デングウイルス遺伝子組込みプラスミドに対する免疫誘導: マウスに3回免疫後、2週目の攻撃実験の前に採血した。血清は PBS 接種グループはプールしたが、それ以外の8グループは個体別に採血し、デングウイルス2型

NGC 株感染 Vero 細胞を用いて測定した。マウス血清中の抗体価は、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：9 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 づつ接種して攻撃した。攻撃後 20 日間マウスの生死と病気の進行状況を観察した。マウスにおける病気の進行状態を正常、初期症状の立毛、後期症状の麻痺、そして死亡と 4 段階に分け、それぞれ 3 から 0 の点数でスコア化して示した。

C. 研究結果

血清中の NGC 株に対する免疫の誘導： Dengue ウイルスの遺伝子を組込んだ 3 種類のプラスミド pcD2ME、pcD2NS3 及び pcD2NS5 をそれぞれ単独で、あるいは pcD2ME と pcD2NS3 及び pcD2NS5 を組合わせたグループに分け、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、Dengue ウイルス 2 型 NGC 株のに対する免疫を、NGC 株を感染させた Vero 細胞を用いた蛍光抗体法で測定した（表 1）。3 回接種後、攻撃実験に先立って採血した 11 週令のそれぞれのグループの血清中の抗 NGC 抗体を個別に調べた。なお、PBS 接種群はプール血清を調べた。

Balb/c マウスに非構造タンパクを組込んだ pcD2NS3 及び pcD2NS5 をそれぞれ単独で 3 回免疫したマウスは免疫後、10 倍ないし 20 倍の抗体価が検出された。pcD2ME を単独で免疫したマウスは 3 回免疫後、20 倍ないし 40 倍の抗体価がみられ、いずれのプラスミドともマウス体内に免疫を誘導していることが確認できた。pcD2ME と

pcD2NS3 を同時に接種したグループは 3 回免疫後、10～160 倍、pcD2ME と pcD2NS5 の組合せでは 20～160 倍、さらに pcD2ME、pcD2NS3 及び pcD2NS5 を同時に接種したグループでは 2 匹が 160 倍を越え、免疫量に比例して抗体価は高くなる傾向を示した。3 種類のプラスミドを種々の組合せで投与したグループの 3 回免疫後の個別別の抗体価は、どの組合せにおいてもかなり大きな個体差がみられた。これらに対して、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 NGC 抗体は全く誘導されなかった。NGC 株を 3 回腹腔に免疫したマウスには 3 回免疫後、一匹が 80 倍で他はいずれも 160 倍以上の抗 NGC 抗体が誘導された。PBS 接種グループには、検知できるレベルの抗体は誘導されなかった。

免疫後のマウス防御効果：5 週令の Balb/c マウスに Dengue ウイルスの遺伝子を組込んだ 3 種類のプラスミド pcD2ME、pcD2NS3 及び pcD2NS5 をそれぞれ単独で、あるいは pcD2ME と pcD2NS3 及び pcD2NS5 を組合わせたグループ及びコントロールの合計 9 グループを 2 週間隔で 3 回免疫後、2 週目に NGC 株と同じ Dengue ウイルス 2 型のトリニダット TR1751 株で攻撃し、攻撃後 20 日までマウスの生死と、病気の動態を観察した。病気の進行状態はスコア化した点数をグループごとに合計した値で示した（表 2）。その結果、pcD2ME、pcD2NS3 及び pcD2NS5 を単独で免疫したマウスは pcD2NS3 の 1 匹を除いて、すべて攻撃後 5～8 日で立毛等の初期症状が出現した。その後発病したマウスはすべて攻撃後 14 日までに死亡した。その中で pcD2ME の 1 匹は発病後病気は進行したが攻撃後 16 日目に回復に転じた。pcD2ME と

pcD2NS3 及び pcD2NS5 を組合わせた 3 グループにおいても pcD2ME と pcD2NS3 を接種したグループの 1 匹を除いてすべてのマウスに症状が出現し、攻撃後 15 日目までにすべて死亡した。pcD2ME と pcD2NS5 を接種したグループは病気の進行にかなりの個体差がみられた。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 6、7 日で初期症状である立毛がみられ、12 日までにすべて死亡した。一方、 9×10^6 PFU の NGC 株で免疫したマウスにおいては、攻撃後 13 日目に 2 匹に立毛症状が現れ、15 日目に死亡したが、他の 3 匹は攻撃後 20 日まで病気症状を示さず生残した。

D. 考察

デングウイルス 2 型 NGC 株のシグナル/prM/E 遺伝子を組込んだプラスミド pcD2ME を用いて免疫したマウスには、中和抗体及びデング 2 型ウイルス特異的な記憶 B 細胞が誘導されることが免疫マウスを NGC 株の腹腔内攻撃によって明らかにされた（平成 10 年度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」）。

DNA ワクチンを筋肉内接種した場合、抗体より CTL を誘導するとされる。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。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（平成 11 年度研究班分担研究報告書「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」）。この時、防御効果を病気の進行あるいは生死で明確に知るために pcD2ME の攻撃実験と異なり脳内接種を試みた。しかし、コントロールのデングウイルス 2 型 NGC 株で免疫したマウスグループにおいて、実験期間内に 4 匹中 3 匹が死亡した。

そこで今回コントロールの NGC 株はウイルスカ価を 3 倍に増やして免疫した。その結果、脳内接種によって防御効果が示されたものと考えられる。脳内攻撃前の血中 IF 抗体価は 1 匹が 80 倍で他の 5 匹は 160 倍以上で、DNA ワクチン免疫グループのマウスに比べて明らかに高い。DNA ワクチンにおいては抗体を感染防御レベルまで上げるためにアジュバント等を検討する必要性を示唆している。

一方、pcD2ME 接種グループの 1 匹は病気から回復している。このグループの IF 抗体価は 20 ないし 40 倍で pcD2NS3 と pcD2NS5 を組合わせたグループより低い。中和エпитープを含む pcD2ME の発現が pcD2NS3 と pcD2NS5 を組合わせたグループでは抑制された可能性がある。同時に、pcD2ME グループの 1 匹であるが攻撃から耐えたことによって今後、攻撃ウイルスの量、攻撃ウイルス株の種類、あるいはより抗体と接触機会のある接種ルートを選択することによってデングウイルス DNA ワクチンの防御効果を病気の進行あるいは生死によって評価できる可能性が示唆された。

今回デングウイルスのシグナル/prM/E 遺伝子カセットと、非構造タン

パクである NS3 と NS5 について免疫原性と防御効果を予備的に検討したが、今後、モノクローナル抗体の移入によりマウスを防御することからフラビウイルス感染症の防御因子の一つとされている NS1 や防御効果が十分検討されていない NS2 と NS4 についても組み込みプラスミドを作製し、単独であるいは pcD2ME と組み合わせることによって DNA ワクチンとしての防御効果を検討する必要がある。

E. 結論

pcDNA3 をベクターとし、デングウイルスのシグナル/prM/E 遺伝子を組み込んだプラスミド pcD2ME、非構造タンパク NS3 と NS5 遺伝子を組み込んだプラスミド pcD2NS3 と pcD2NS5 はマウスにおいて免疫原性を示し、pcD2ME に pcD2NS3 と pcD2NS5 を組み合わせることによって免疫量を増やすと IF 抗体価は上昇した。しかし、今回免疫マウスの脳内攻撃実験では防御免疫を誘導できるか否かについての明確なデータは得られなかった。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

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. *Virology* 268, 49-55 (2000).

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).

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得

特になし。

2. 実用新案登録

特になし。

3. その他

特になし。

表1 デングDNAワクチン3回免疫マウスにおける抗デングウイルス免疫の誘導^a

免疫原	投与量 ^b	投与経路	IF抗体価 ^c				
pcD2ME	100ug	i.m.	20	40	40	20	40
pcD2NS3	100ug	i.m.	10	20	20	20	10
pcD2NS5	100ug	i.m.	10	20	20	20	10
pcD2ME+NS3	100ug+100ug	i.m.	10	10	40	80	160
pcD2ME+NS5	100ug+100ug	i.m.	40	160	160	40	20
pcD2ME+NS3+NS5	100ug+100ug+100ug	i.m.	160 \leq	40	20	80	160 \leq
pcDNA3	100ug	i.m.	<10	<10	<10	<10	<10
PBS		i.m.			<10 ^d		
DEN2NGC ^e	9x10 ⁶ PFU	i.p.	160 \leq	80	160 \leq	160 \leq	160 \leq

a 各免疫原をグループ当たり5匹の5週令雌Balb/cマウスに2週間隔で3回接種した。3回接種後2週目に採血し、個体別に抗デングウイルス抗体価を測定した。

b 投与量/回/マウス

c NGC株感染Vero細胞を用いた蛍光抗体法

d プール血清

e デングウイルス2型ニューギニアC株

表2 デングDNAワクチン3回免疫マウスにおける防御免疫の誘導^a

免疫原	攻撃後の日数																			
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
pcD2ME	15	15	15	15	15	14	11	7	6	6	4	1	1	1	1	2	2	3	3	3
pcD2NS3	15	15	15	15	15	15	15	9	5	5	3	1	1	0	0	0	0	0	0	0
pcD2NS5	15	15	15	15	15	15	15	10	7	7	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
pcD2ME+NS3	15	15	15	15	15	15	14	9	4	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
pcD2ME+NS5	15	15	15	15	15	14	12	8	6	5	2	2	1	1	0	0	0	0	0	0
pcD2ME+NS3+NS5	15	15	15	15	15	14	8	4	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
pcDNA3	15	15	15	15	15	15	14	7	4	3	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
PBS	15	15	15	15	15	15	15	10	7	7	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
DEN2NGC ^b	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	13	11	9	9	9	9	9	9

a 各免疫原をグループ当たり5匹の5週令雌Balb/cマウスに2週間隔で3回接種した。3回接種後2週目に3.2HAUのデングウイルス2型トリニダットTR1751株を脳内に0.2Mℓずつ接種して攻撃した。攻撃後病状を正常、立毛、麻痺、死亡の順に3、2、1、0の点数を与え、各々のグループ毎に合計して防御免疫の誘導を検討した。

b デングウイルス2型ニューギニアC株

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
Konishi E., Yamaoka M. Kurane I. 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	268	49-55	2000