

表1 PCRの改良方法

蚊のゲノムDNA抽出：個別蚊、IsoQuick (MicroProbe Corporation社製、東京 豊橋機械店販売)

ゲノムDNAベレット/雌蚊 + 20μlの蒸留水で溶解

ゲノムDNAの再精製：DNeasy Tissue Kit (Qiagen社製) 最終容量100μl

PCR反応：PCR SUPER Mix High Fidelity (Gibco BRL社製)

Primers (Oligonucleotide sequence: 5' → 3')\*

5.8S primer (ITS 2) TGT GAA CTG CAG GAC ACA T

28S primer (ITS 2) TTG CTT AAA TTT CAG GGG GT

\* Conserved primers for amplification of ITS2 from many Diptera

0.5ml Microtube使用 (ASTEC社装置使用)

Template DNA 1.5 μl (約50 ng) 注意：1 μlの場合はdH2Oを0.5 μl追加

5.8S primer(10 pmol/μl) 0.5 μl

28S primer(10 pmol/μl) 0.5 μl

Super Mix (Gibco BRL社製) 22.5 μl

Total volume 25 μl

注意：template DNAが1.5 μl以内におさまらないときは、

total volumeが少し超えてもPCR可能 (例：26.5 μl)

温度設定条件：PCR反応：(1回) 94℃ 2分, (35回) 94℃ 1分, 53℃ 1分, 68℃ 2分, (1回) 68℃ 7分, 4℃

PCR産物：1.2% agarose gel 電気泳動

\* Paskewitz, S.M. and Collins, F.H.(1997): PCR amplification of insect ribosomal DNA. In: The molecular biology of insect disease vectors. A methods manual (Edited by J.M.Crampton, C.B.Beard, and C.Louis) 374-383. Chapman & Hall

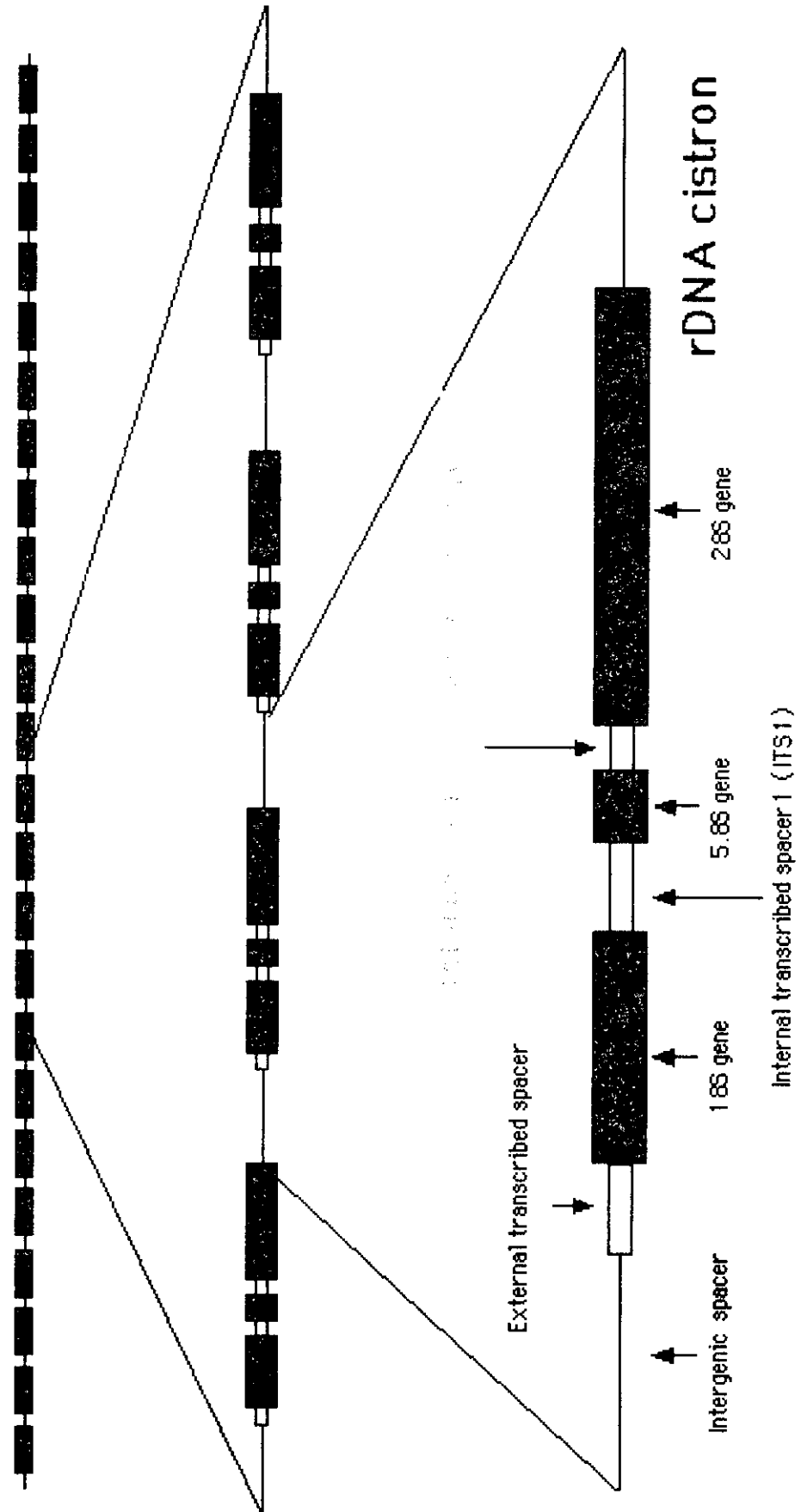
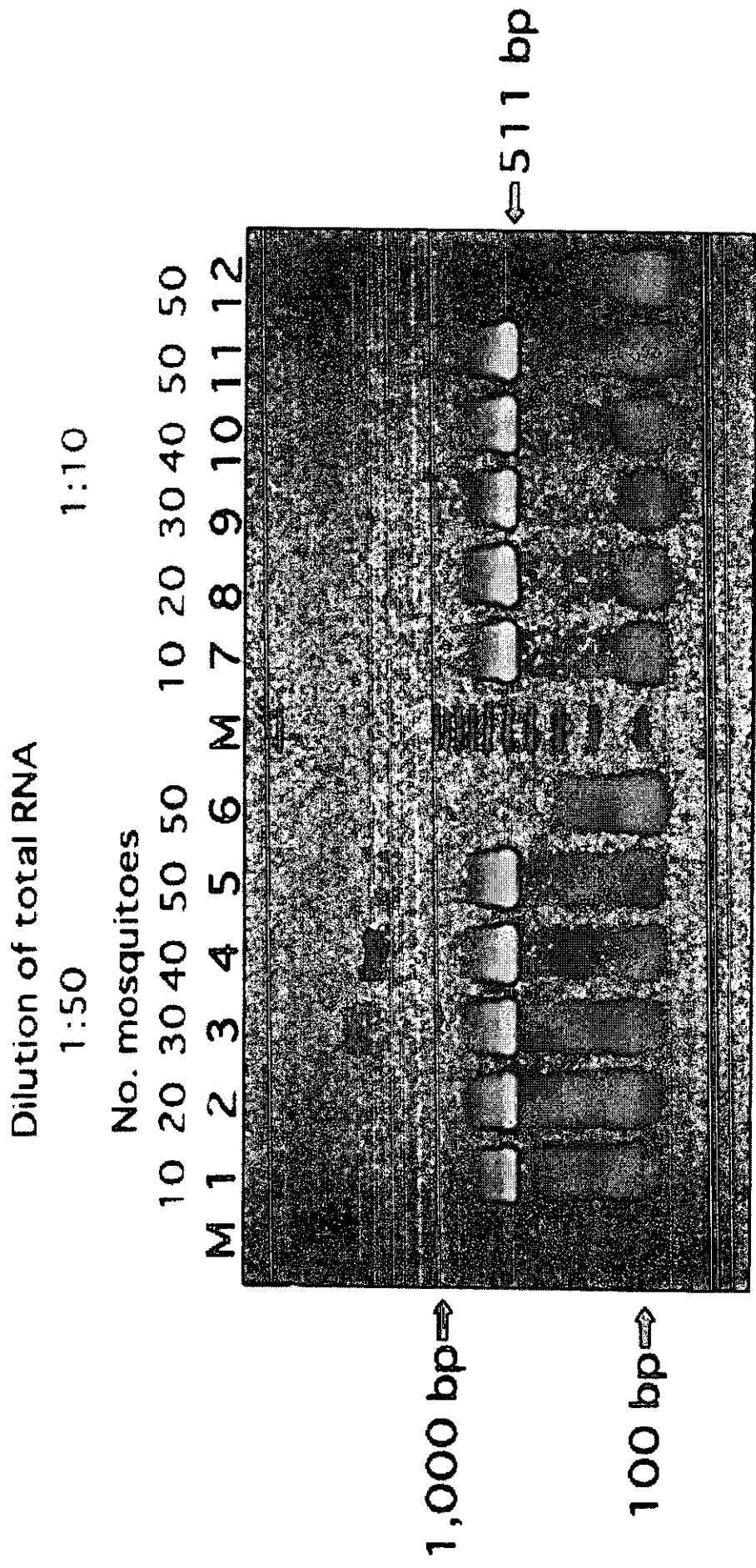


Fig. 1.0 Internal transcribe 2 (ITS 2) region in tandem-repeated rDNA cistron of *Aedes* mosquito genomic DNA



**Fig.1** RT-PCR products of Qiagen RNeasy Mini Kit-purified total RNAs derived from intrathoracically dengue virus infected one *Aedes aegypti* female with different number of negative mosquitoes.

M: Marker (100bp ladder), Lane 1 -5: 1 dengue serotype 2 virus infected mosquito, containing with 9, 19, 29, 39 and 49 negative ones, respectively, and dengue consensus primers for RT-PCR. Lane 6 and 12: no viral genome with the primers as negative control.

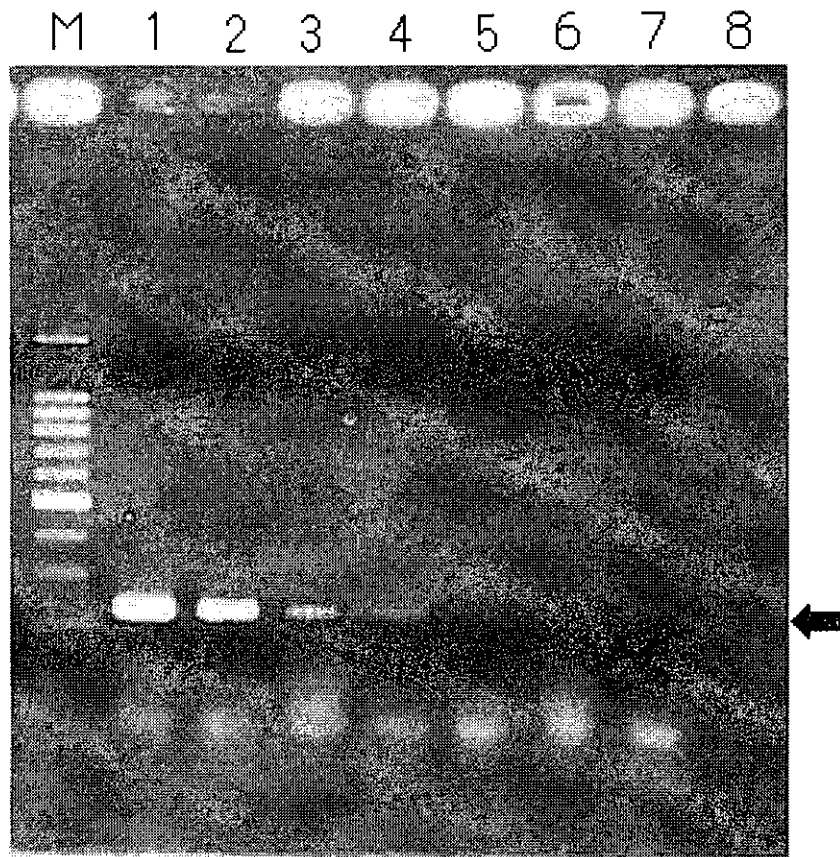


Fig.1.2 PCR products of West Nile viral genome in *Culex pipiens pallens* harvested after 14 days of intrathoracic inoculation

M: 100bp molecular marker, 1: 10 to 7 pfu/tube, 2:10 to 6 pfu/tube,3: 10 to 5 pfu/tube, 4:10 to 4 pfu/tube,5: 10 to 3 pfu/tube, 6:10 to 2 pfu/tube,7: 10 to 1 pfu/tube, 8: Negative control

M 1 2 3 4 5 6 7 M

530 →  
bp

← 350  
bp

Japan Oahu, USA Thailand LC, USA Thailand Africa Guatemala

*Ae. albopictus*

*Ae. aegypti*

図1. 蚊ゲノムDNA上にあるrDNAシストロンのITS2領域をPCRして得られた増幅産物の電気泳動パターン。  
Mは100bpのラダーマーカー。レーン1~4はそれぞれ日本、アメリカ (OAHU)、タイ国、アメリカ (LC) 産  
ヒトスジシマカのPCR産物、レーン5~7はそれぞれタイ国、アフリカ、グアテマラ産ネッタイシマカのPCR産物

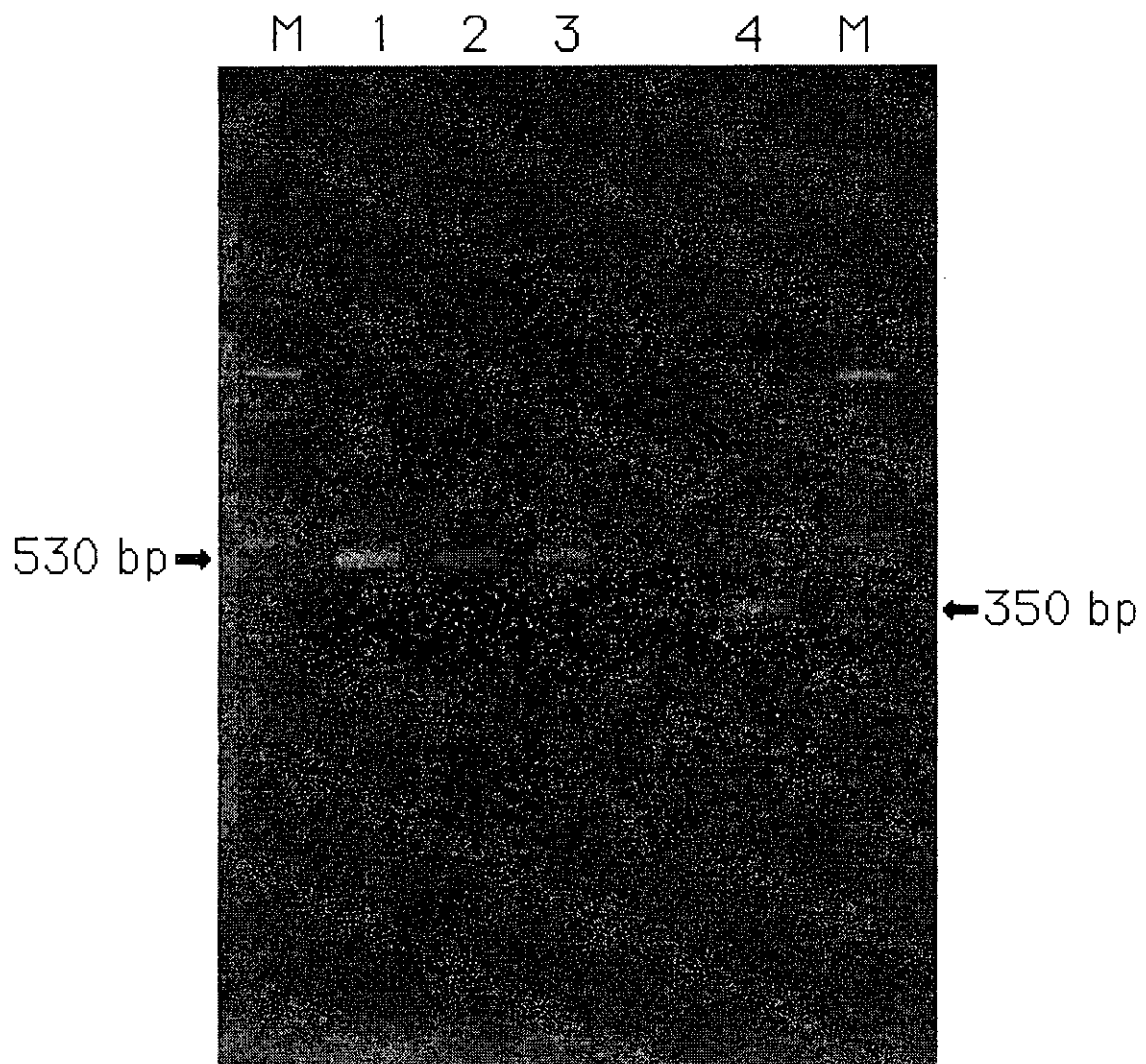


Fig. 1.3 PCR products of geographically different *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti* mosquitoes

M: 100bp ladder DNA marker; 1: *Aedes albopictus* from Thailand; 2 and 3: *Aedes albopictus* from Italy; 4: *Aedes aegypti* from Thailand

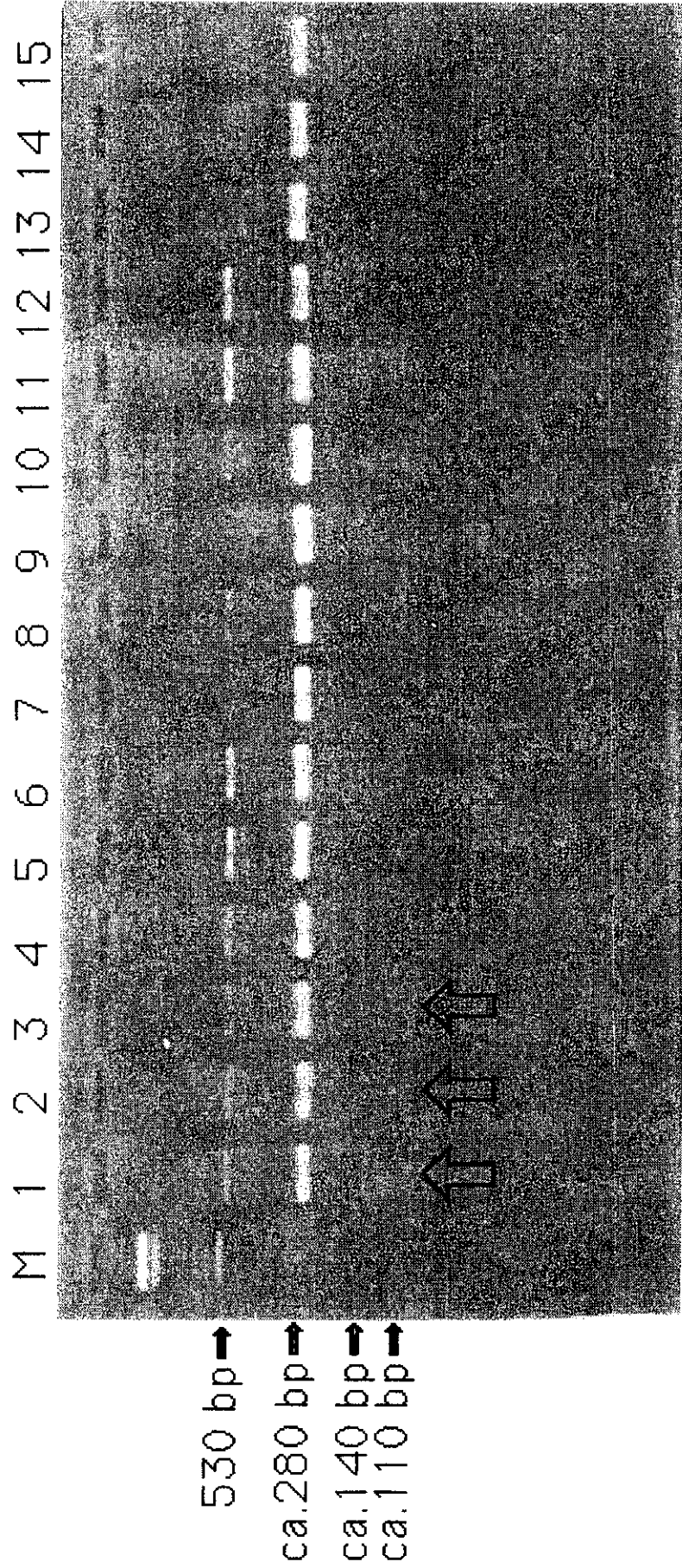


Fig. 2 *Hin* f1 digested PCR products derived from geographically different *Aedes albopictus* mosquitoes

M: 100 bp ladder DNA marker; 1-3: Japan; 4-6: Thailand; 7-9: Oahu from USA; 10-12: Louisiana from USA; 13-15: Albania from Italy; ↑ :140 and 110 bp bands

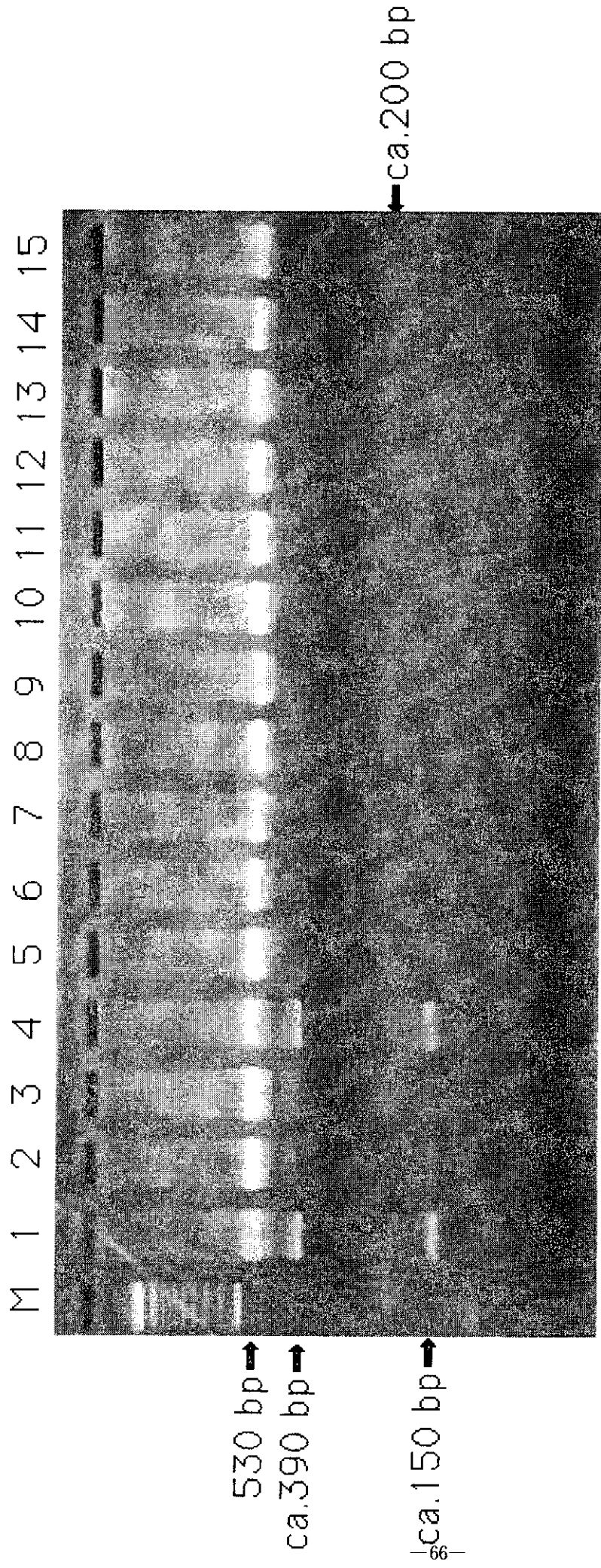


Fig. 3 Mlu I digested PCR products derived from geographically different *Aedes albopictus* mosquitoes

M: 100 bp ladder DNA marker; 1-3: Japan; 4-6: Thailand; 7-9: Oahu from USA; 10-12: Louisiana from USA; 13-15: Albania from Italy



デング熱媒介蚊の寄生原虫 *Ascogregarina* spp.を用いた新しい防除法 について

分担研究者 安居院 宣昭(国立感染症研究所・昆虫医科学部)

共同研究者 小林 睦生・二瓶 直子・佐々木年則(国立感染症研究所・昆虫医科学部)

研究要旨

昨年に引き続きヤブカ幼虫に寄生する原虫 *Ascogregarina* spp.がどの程度広範に本邦産 ヤブカ類に認められるか調べた。その結果、ヒトスジシマカに寄生する原虫は東北から沖縄まで広く分布が確認された。また、ヤマトヤブカに寄生する原虫は釜石および大船で複数の発生源より確認された。また、タイ国産のネッタシマカより同様の原虫の寄生を確認して、走査電子顕微鏡3種のオーシスト、栄養体を観察したところ3種を区別する事が可能となった。ヒトスジシマカとネッタシマカ由来のオーシストの熱耐性を調べたところ、40℃の15分間処理では死ななかつたが、45℃の処理ではほとんどのオーシストが死滅する事が明らかになった。また、オーシストの低温耐性を調べた結果、ネッタシマカ由来の *Ascogregarina culicis* は-18℃および-26℃の処理に対してほとんど影響を受けなかつたが、ヒトスジシマカ由来の *A. taiwanensis* は低温処理で多くが死滅した。温帯産の *A. taiwanensis* は熱帯産の原虫より低温に弱い事が明らかになった。この原虫は宿主特定性が高く、取り扱いや大量増殖が容易で、多数のオーシストを回収する事が可能なため、*Ascogregarina* spp.を外来遺伝子の運びや(遺伝子ベクター)として利用し、デング熱媒介蚊の新しい防除法を確立する方法を予備的に検討した。

A 研究目的

デング熱およびデング出血熱は東南アジア、中南米、南太平洋諸島を中心に猛威を振るっており、毎年、10万人以上がデング出血熱またはデングショック症候で死亡していると考えられている。媒介蚊は主にネッタシマカとヒトスジシマカである。ヒトスジシマカは東南アジアを起源とするヤブカで、1942-1945年の長崎、大阪などでのデング熱の流行時に媒介蚊となったことが知られている。2001年に米国ハワイ州でヒトスジシマカが関わるデング熱の流行がマウイおよびオアフ島を中心に起こった。ヒトスジシマカはネズミなどの小型ほ乳動物、イヌ、猫島の中型ほ乳動物、また、鳥類などからも吸血する事が知られており、ヒトからも好んで吸血する。幼虫発生源はネッタシマ

カと類似しているが、東南アジアでは都市部より都市部周辺に分布が多い事が認められている。しかし、我が国のヒトスジシマカは都市部に多い傾向があり、墓地の花立て、プラスチック容器、古タイヤ等が重要な発生源になっている。また、熱帯・亜熱帯ではある種の植物の葉腋に溜まった少量の水にヒトスジシマカが発生する場合があります、これらに発生した幼虫を適切に駆除することは非常に困難と考えられている。我が国のヒトスジシマカの分布北限は1990年代前半では仙台市が太平洋側の分布限界地域となっていた。最近の我々の調査では、日本海側で能代市まで、また、内陸部では秋田県の横手市、太平洋岸では大船渡で同蚊の分布が確認され、1998年の分布北限と比べた場合、約100Km以上北限が北上したことになった。これは急激な年平均気温の

上昇が関係していると考えられ、地理情報システムを利用したメッシュ気候図の作成でより詳細に解析出来るようになってきた。我が国へのデング熱患者の輸入症例は着実に増加する傾向にあり、今後、我が国での二次感染が起こる可能性も視野に入れてヒトスジシマカの防除対策を考える事が必要である。ヤブカ類に寄生が見られる*Ascogregarina* spp.は孢子虫類のグレガリナ目に属する寄生原虫である。最初に記載された寄生原虫の属名は*Gregarina*で、その後*Lankesteria Ascocystis*と変遷がみられるが、現在はDiplocystidae科の*Ascogregarina*属に統一されている。現在までに6種類ほどがヤブカ類から記載されているが、栄養体の形態、ガメシストの直径、オーシストの大きさおよび宿主特異性が分類の根拠になっている。1980年に台湾のヒトスジシマカから*Ascogregarina taiwanensis*が初めて記載された(Lien & Levine, 1980)。しかし、我が国のヒトスジシマカに関しては全くこの原虫に関して調査がされていなかった。昨年に引き続き、我が国のヒトスジシマカ幼虫にどの程度*A. taiwanensis*の寄生が見られるか、調査を継続している。また、走査電子顕微鏡での詳細な観察によって、明瞭な種間の形態的差を検察すること、また、将来の外来遺伝子の運びやとしての利用を考え、熱耐性を調べ、遺伝子導入のための基礎実験を行う事を計画し、その実験法を検討した。

## B 研究方法

ヤブカ幼虫は、墓地の花立て、古タイヤ等の人工容器から駒込ピペットを用いて幼虫を採集し、約100 mlのポリエチレン容器に入れて研究所に持ち帰った。終令幼虫まで飼育し、*Ascogregarina*栄養体の寄生を確認するために、実体顕微鏡下で幼虫を解剖し、中腸を摘出後、囲食膜に囲まれた未消化物を膜ごとピンセットで取り出した。中腸をスライドガラス上のPBS(Dulbecco's, pH 7.0) 1滴中に置き、

カバーガラスをかけて光学顕微鏡で観察した。栄養体の超微形態を観察するために、必要に応じて2.5% glutaraldehydeと2% paraformaldehyde(0.1M PBS, pH 7.2)で固定を行った。また、採集されたヤブカ幼虫は種の同定を行うために成虫まで飼育した。

実験感染は、5-10  $\mu$  l当たりのオーシスト数を算出し、ヤブカ幼虫1匹当たり100-300個ほどのオーシストを感染させるように調整し、1令幼虫に与えた。その後感染幼虫を飼育し、羽化後成虫のマルピギー管からオーシストを多数回収し実験に用いた。

オーシストの高温耐性および低温耐性は、*A. taiwanensis*および*A. culicis*のオーシスト約500個を5 mlのチューブにいれ、30°C, 35°C, 40°C, 45°C, 50°C, 55°Cの温水に15分間処理した。その後室温に戻してからヒトスジシマカまたはネッタイシマカの孵化直後の幼虫を10匹入れ、摂食感染させた。

チューブ内で4令まで飼育後、おのおのの処理幼虫を解剖し、中腸内の栄養体数を数えた。また、低温耐性の実験においても、同様のオーシストを用い、-18°Cおよび-26°Cの冷凍庫で15分間処理し、上記と同様に1令幼虫に摂食感染させ、その後解剖して栄養体数を数えた。

(倫理面への配慮： 野外での蚊幼虫採集および寄生原虫の実験室内での観察等が主な研究方法であるので、特に問題ない)

## C 研究結果

### 1. 本邦産ヒトスジシマカ(*Ascogregarina* sp.)の寄生状況

野外採集した幼虫における*Ascogregarina*原虫の感染状況は、幼虫発生場所によって異なっており、寄生率は0から100%まで認められた。これはオーシストの乾燥抵抗性の低さに関係している可能性が考えられる。幼虫当

たりの栄養体寄生数はコロニーによって38.5-209と幅があり、同じコロニーでも大きな差が認められた。その他、横浜市、白河市・会津若松市、秋田市、那覇市、福井市、成田空港等から採集されたヒトスジシマカに寄生原虫が認められた(図1)。また、宮古島平良市で採集されたヒトスジシマカでは88.9%(16/18)のコロニーに原虫の寄生が認められ、伊良部島でも85.7%(6/7)に寄生が認められた。これらの結果は日本国内に分布するヒトスジシマカに普通に原虫の寄生が認められる事を示している。また、ヤマトヤブカの*Ascogregarina* sp.は岩手県の2都市(釜石市、大船渡市)に寄生が確認された。

## 2 ヒトスジシマカおよびネッタシマカ由来の原虫オーシストの熱耐性

*Ascogregarina* spp.原虫に外来遺伝子を導入するための予備実験として、オーシストの高熱耐性を調べた(図2)。その結果、*A. taiwanensis*および*A. culicis*の両種とも30-40°Cまでの処理では生存にほとんど影響を与えなかったが、45°Cで処理したオーシストを感染させた幼虫を解剖した場合、非常に少数の栄養体しか検出されず、また、栄養体の形態が異常で一部組織崩壊を起こしていた(図3, 4)。ネッタシマカおよびヒトスジシマカの幼虫は小容量の容器に発生する傾向が高く、熱帯・亜熱帯および温帯地域の夏期には、直射日光が当たる小容器内の水温は40°Cを越える。しかし、一般に幼虫が発見される容器は木陰や物陰の場合が多く、この事が両種のヤブカ幼虫および寄生原虫の生存にプラスに働いていると考えられる。両種の原虫オーシストを0°C以下の低温で処理し、原虫の生存に与える影響を調べた。その結果、ネッタシマカ由来の*A. culicis*は-18°Cおよび-26°Cの処理に対してほとんど影響を受ける事がなく、対照実験区の栄養体数と差が見られなかったが、ヒトスジシマカ由来の*A. taiwanensis*では、両低温

処理がオーシストに致命的な影響を与え、終令幼虫からの検出数は激減した(図6)。熱帯産の原虫が低温に対して耐性があり、熱帯から温帯地域にまで分布するヒトスジシマカの寄生原虫が低温に弱いとの興味ある結果が得られた。

## 3 走査電子顕微鏡による*Ascogregarina* spp.の観察

図5に3種の*Ascogregarina* spp.の微細構造を昨年に引き続き詳細に観察し、構造の違いが明らかになるようにまとめた。

(栄養体)

終令幼虫の中腸内で*Ascogregarina*栄養体は、光学顕微鏡では全体が茶褐色に見え、拡大すると内部に褐色の微少な顆粒が多数存在するのが観察されたが、形態的には多型を示した。走査電顕での観察では、前端部から後端部へ体表全体に細かいひだが存在しており、低倍での観察では3種の違いを認めることは出来なかった。栄養体の前端部の一部分は中腸の微絨毛に埋没して固着しているのが観察された。栄養体後端部の観察では、ヒトスジシマカの*A. taiwanensis*は突起(mucron)が認められ、他2種の形態と明らかに異なっていた。ネッタシマカの*A. culicis*は、突起が無く、ひだ構造が後端中央でほぼ終わっていた。一方、ヤマトヤブカ由来の*Ascogregarina* sp.は、ひだ構造が後端中央を越えて反対側まで到達しており、他2種と明らかに構造が異なっていた(図2)。

(オーシスト)

3種のオーシストは、長径8-12  $\mu$ m、短径4-5  $\mu$ mのレモン型をした構造を持っている。3種のオーシストを走査電顕の観察したところ、*A. taiwanensis*のオーシストは表面に微細な突起構造が認められたが、ヤマトヤブカのものでは表面が非常にスムーズで、全く突起構造が認められなかった。一方、ネッタシマカ由来のオーシストでは、表面全体に均一の構

造物が存在しており、その中に規則的な突起が観察された。これらの観察から、走査電顕を用いると3種を明らかに分類する事が可能であることが明らかとなった(図2)。なお、種々の形態的観察および文献的検討よりヤマトヤブカから分離された*Ascogregarina* sp. は新種と考えられる。

#### D 考察

1895年にマラリアが蚊によって媒介される事を証明した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*として統一されている。今までに6種ほどがヤブカ類に寄生が認められ、これらの原虫が寄生が宿主(蚊の幼虫)の死亡率を高めるとの報告が一部見られるが、今年の我々の報告で、100-200匹程度の栄養体の寄生では、顕著な死亡率の上昇は見られなかった。*Ascogregarina*の感染初期では、オーシスト内のスポロゾイトが中腸上皮細胞内に侵入し、ある程度の大きさの栄養体に発育してから中腸内腔に脱出し、絨毛に先端部を固着させて発育する。体長20-30 $\mu$ m程の初期の栄養体が上皮細胞から脱出する事から、中腸内の細菌等の感染が起こる可能性が考えられる。また、破壊された上皮細胞は速やかに再生される事が予想される。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。今年の研究で、我が国の2種のヤブカから原虫の寄生を認めたが、特に*A. taiwanensis*は今年の調査

でも頻度高く寄生を認めた。将来、これらの寄生原虫に外来遺伝子を導入し、ヤブカ幼虫に感染させる事によって、デング熱媒介蚊を防除する可能性を検討した。原虫のスポロゾイトに遺伝子を導入する予備実験として、高温耐性の程度を2種の原虫で調べた。45℃15分間の処理でほぼ致死的效果が確認されているので、ヒートショックタンパク質(HSP)のプロモーターを含む外来遺伝子導入原虫の分離に応用出来る可能性が示唆された。どのような外来遺伝子を導入すると効果的に媒介蚊を防除出来るか検討中であるが、交尾拒否に関わるペプチド等が候補分子として考えられる。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。

#### 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昨年に引き続き調査した。その結果、東北、関東、関西、沖縄地方等広範に*A. taiwanensis*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し、タイ国チェンマイ市で採集したネッタイシマカからも同様の原虫を分離した。3種の寄生原虫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.は新種と考えられた。

これらの寄生原虫は宿主特異性が高く、容易に大量増殖が可能である事から、外来遺伝子

を導入し、ヤブカ幼虫に感染させる事によって、デング熱媒介蚊を防除する可能性が考えられる。原虫のスポロゾイトに遺伝子を導入する予備実験として、2種原虫の高温耐性を調べた。45°C15分間の処理ではほぼ致死的效果が確認されているので、ヒートショックタンパク質(HSP)のプロモーターを利用した外来遺伝子の導入原虫の分離に利用出来る可能性が示唆された。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デング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) Kobayashi, M., Nihei, N. & Kurihara, T (2002): Analysis of northern distribution of *Aedes albopictus*(Diptera:Culicidae) in Japan by geographical information system. J. Med. Entomol. 39(1):4-11..
- 2) Sasaki, T., Kobayashi, M. & Agui, N.(2002): Detection of *Bartonella quintana* from bodylice, *Pediculus humanus*(Anoplura :Pediculidae), infesting homeless people in Tokyo by molecular technique. J. Med. Entomol. 39:(in press)
- 3)Nihei,N. and Kobayashi, M. (2001): Use of GIS/RS for the analysis of endemic parasitic diseases. ASIA GIS Symposium 2001, 7.(CD-ROM)
- 4)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
- 5)二瓶直子、小林睦生(2001):地理情報システムGISの感染症領域への応用。Lab. Clin. Pract., 19(19):18-21
- 6)小林睦生、佐々木年則、安居院宣昭(2001)

:路上生活者より採取されたコロモジラミから*Bartonella quintana*が検出された。  
病原微生物検出情報、22:86.

### 2.学会発表

- 1)Nihei, N. and Kobayashi, M. (2001): Use of GIS/RS for the analysis of endemic parasitic diseases. 第4回ASIA GIS学会、シンポジウム、2001, 7.
- 2)小林睦生、二瓶直子、栗原 毅(2001)本州寒冷地でのヒトスジシマカの分布について。第53回日本衛生動物学会、4月4日 山形。
- 3)小林睦生、二瓶直子、齊藤典子、佐々木年則、栗原 毅、安居院宣昭(2001)岩手県産ヤマトヤブカに認められた寄生原虫 *Ascogregarina* sp. について。第53回日本衛生動物学会、4月4日 山形。
- 4)池田 満、佐々木年則、小林睦生(2001) *Anopheles stephensi*の中腸内細菌がねずみマラリアの発育に与える影響。第53回日本衛生動物学会、4月4日 山形。
- 5)佐々木年則、小林睦生、安居院宣昭(2001)蚊体液中に含まれるシアル酸特異的レクチンの構造解析。第53回日本衛生動物学会、4月4日 山形。
- 6)佐々木年則、小林睦生、安居院宣昭(2001)コロモジラミからの塹壕熱病原体、*Bartonella quintana*の検出。第53回日本衛生動物学会、4月4日 山形。
- 7)安居院宣昭、小林睦生、佐々木年則(2001)O157汚染イエバエによる食品汚染能の検討。第53回日本衛生動物学会、4月4日山形。

## 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

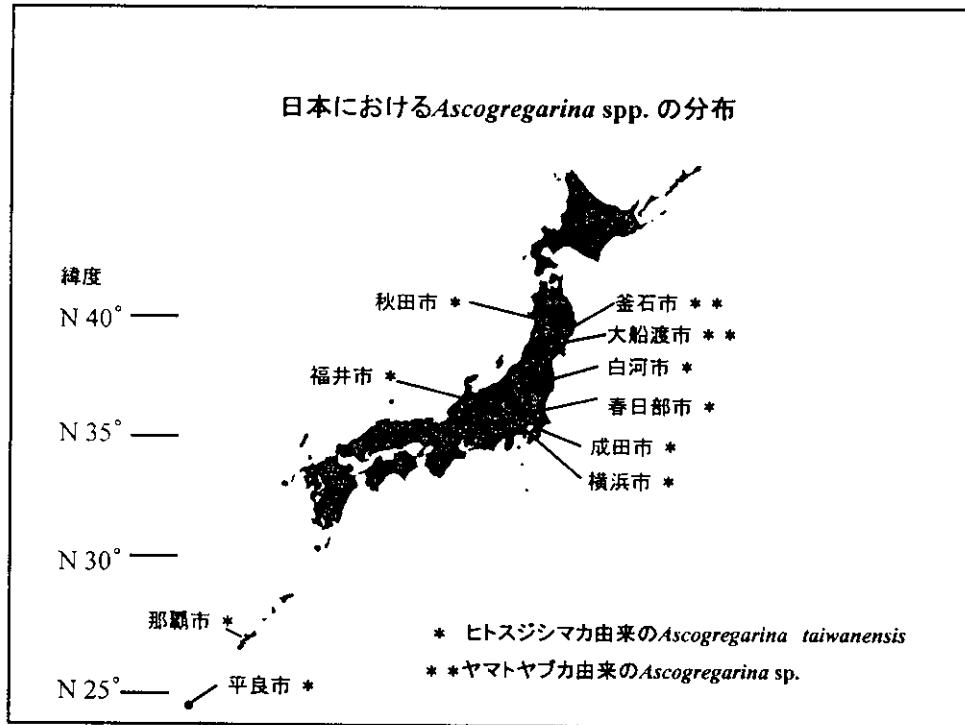


図 2

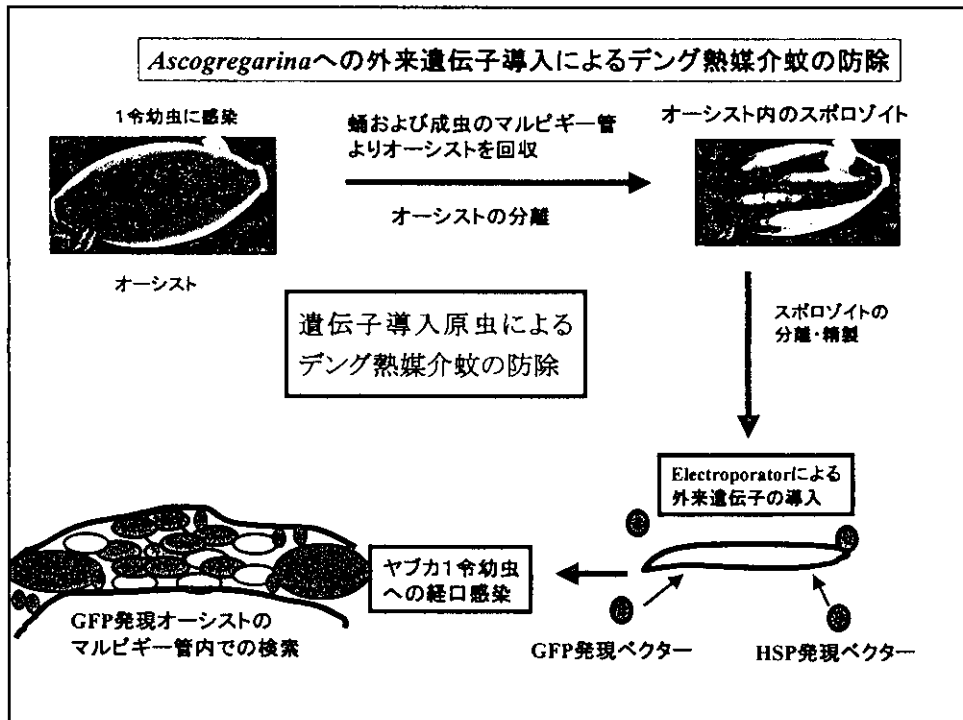


図 3

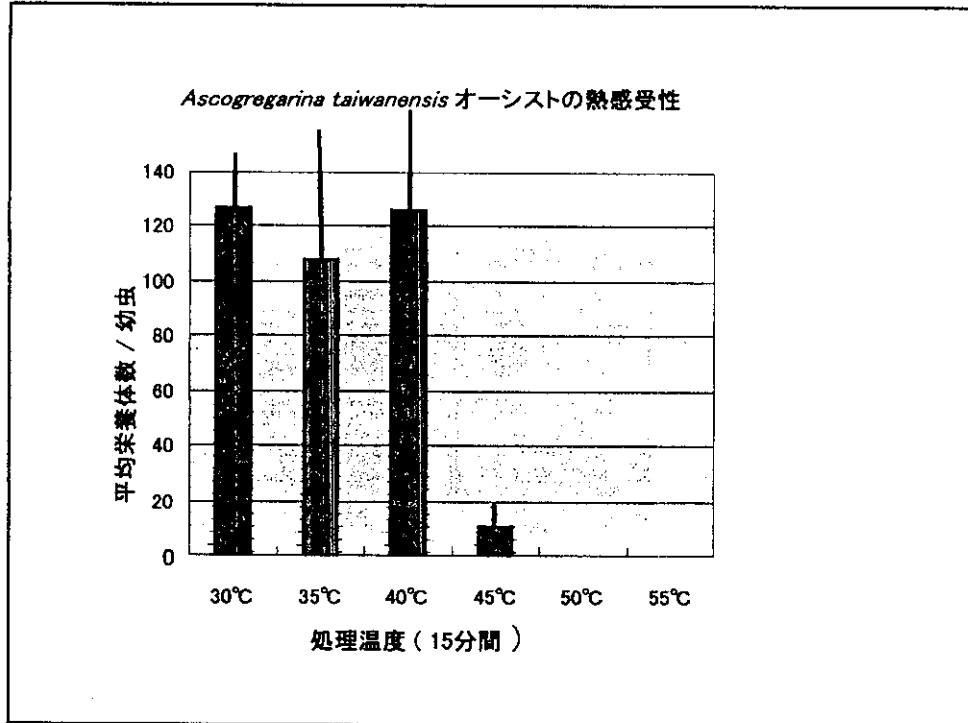


図 4

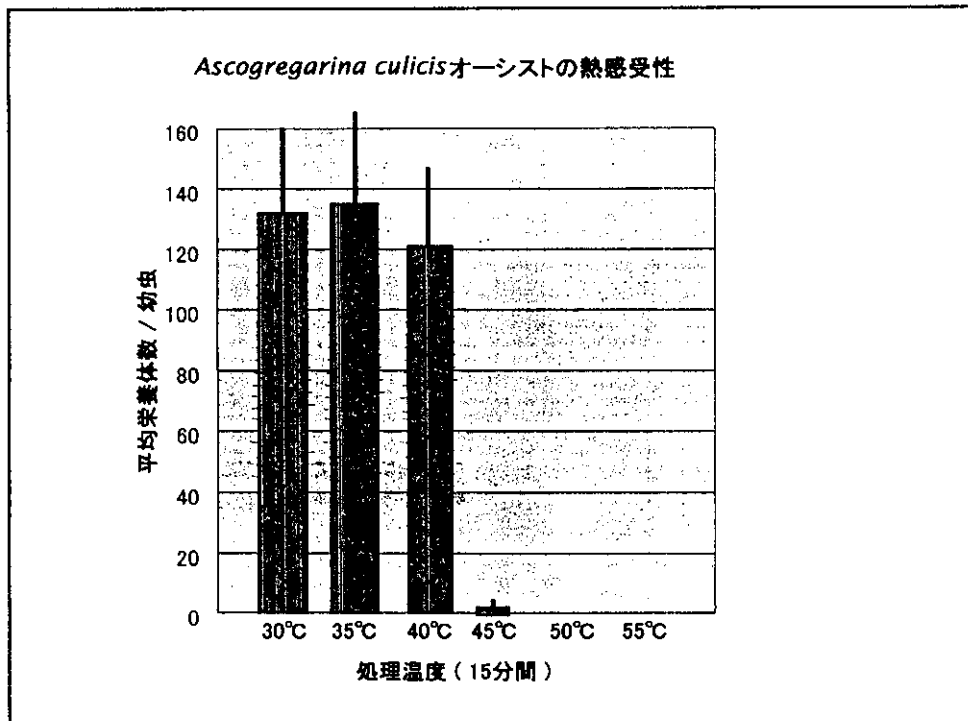


図 5

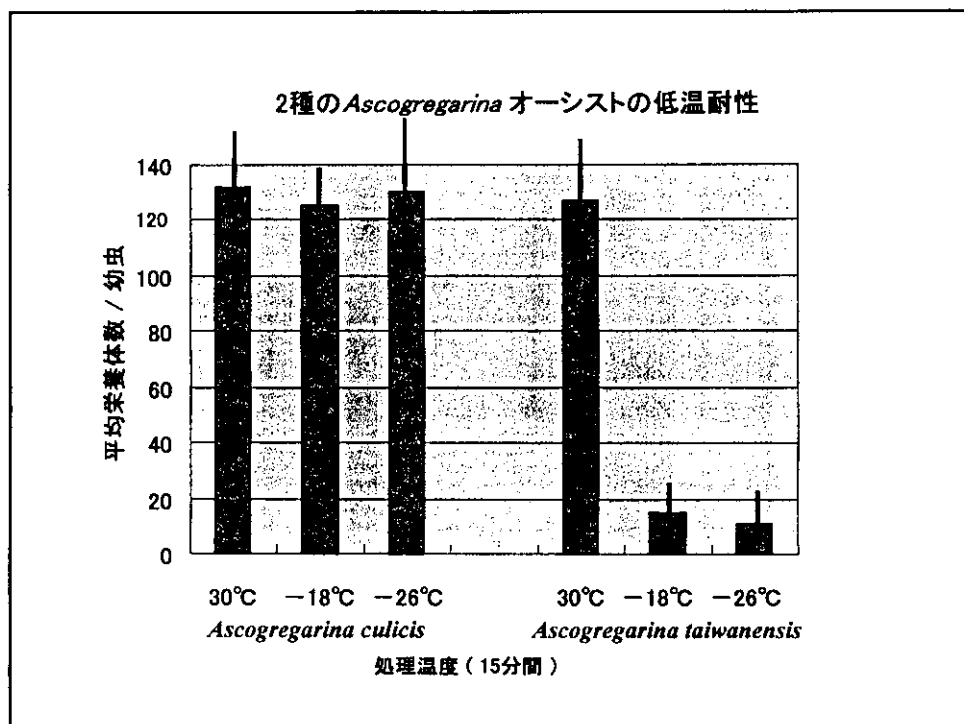
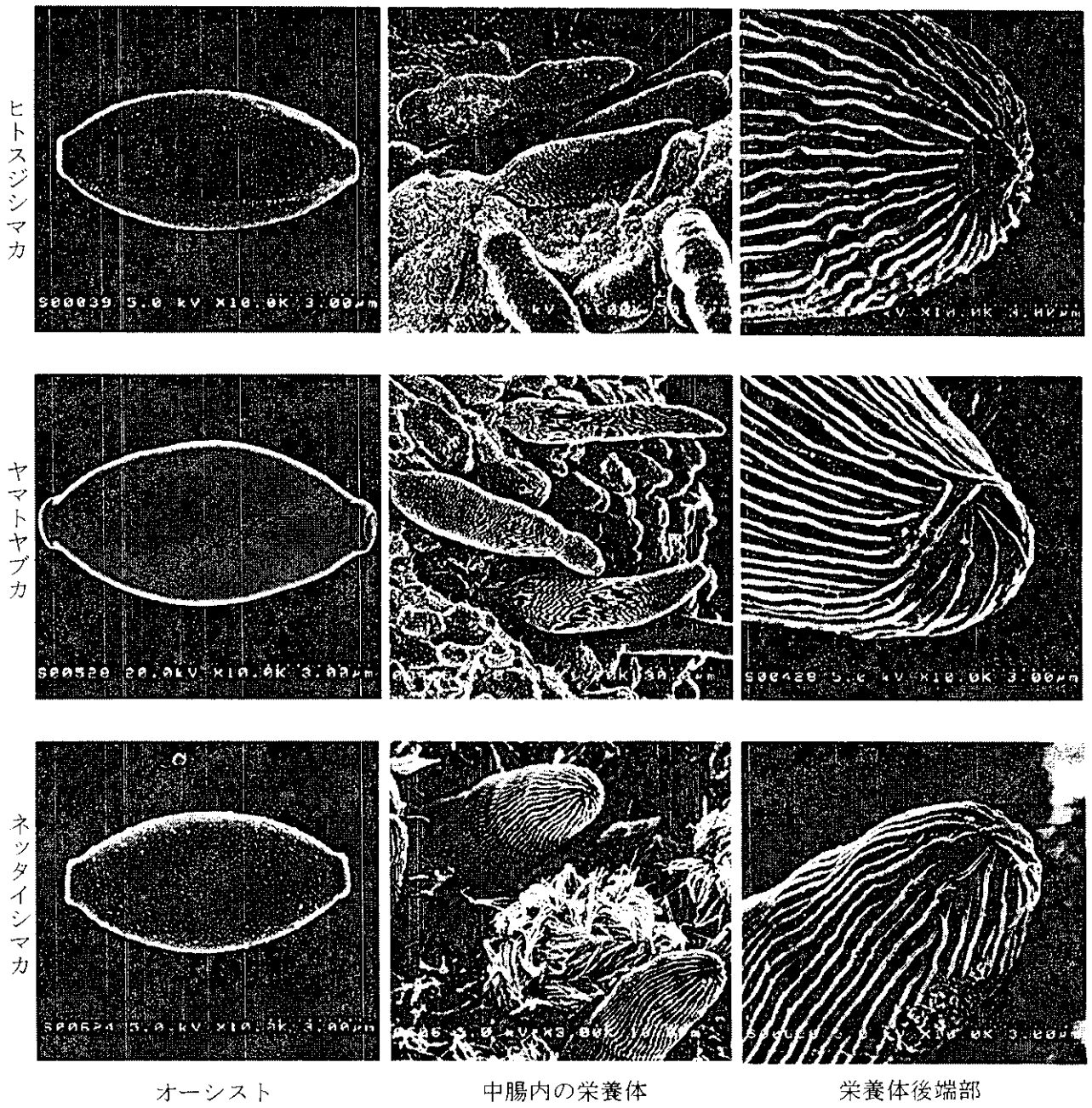




図6 3種ヤブカ由来の *Ascogregarina* spp. の微細構造



## リポソームによる日本脳炎DNAワクチンの免疫誘導促進 （続報）

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** 昨年、米国V社が開発中のリポソーム試薬が、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）の中和抗体誘導能を促進することを、雄BALB/cマウスを用いた実験で示した。今回、さらに2系統のマウスを加え、日本脳炎不活化ワクチン（JEVAX）により誘導される中和抗体のレベルと比較しながら、リポソーム試薬のアジュバント効果を検討した。その結果、雄ICRマウスにおいてpcJEMEの中和抗体誘導能はリポソームと調合することにより上昇し、アジュバント効果が示された。しかし、雌ICRマウスにおいては効果が認められなかった。雌においてリポソームがアジュバント効果を示さないことは、BALB/cおよびddYマウスにおいても認められた。国家検定に用いられる1/64ドーズのJEVAXと50 µgのpcJEMEを比較した結果、ICR系統の雄においてはリポソームと調合した場合、またICRおよびddY系統の雌においては調合しない場合に、同等の中和抗体価が誘導された。以上の結果より、リポソーム試薬はDNAワクチンにアジュバント効果を示すが、今回用いた調合条件においては効果に性差が認められた。

### A. 研究目的

日本脳炎は、アジアにおいて年間5万例の患者と1万例の死者が報告されている重要な神経性ウイルス疾患である。唯一国際的に認可さ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（JEVAX）であるが、高価なため流行国に普及させることが困難と考えられている。最近開発されてきたDNAワクチンは、遺伝子導入型ワクチンの1つであり、蛋白そのものを導入する不活化ワクチンとは戦略を異にする。安価に製造でき、またコールドチェーンを必要としないと考えられるので、熱帯諸国におけるワクチン普及に適すると思われる。

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）を候補日本脳炎DNAワクチンとして作製し、マウスに防御をもたらすことを報告してきた。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、日本脳炎DNAワクチンの場合にも該当した。日本脳炎に対する防御免疫には中和抗体が最も重要であり、DNAワクチンの中和抗体誘導能を高めることは、防御効力を高めるためにも、また接種DNA量を低くするためにも、重要と考えられる。

昨年度の報告（平成12年度厚生省科学研究費補助金「節足動物媒介性ウイルスに対する診断法の確立、疫学及びワクチン開発に関する研究」研究報告書『リポソームによる日本脳炎DNAワクチンの免疫誘導促進』）において、米国V社が開発中のリポソ

ーム試薬が、pcJEMEの中和抗体誘導能を促進することを、雄BALB/cマウスを用いた実験で示した。今回、さらに2系統のマウスを加え、JEVAXにより誘導される中和抗体のレベルと比較しながら、リポソーム試薬のアジュバント効果を検討した。

## 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年度厚生省科学研究費補助金「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、リポソーム試薬（昨年度報告のリポソームAに相当）の分与を受けた。インフルエンザDNAワクチンの抗体誘導能が、このリポソームにより増強したことが報告されている。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。

**JEVAX：**田辺製薬から購入した。国家検定に準じて、マウスあたり32倍希釈液の0.5mlを腹腔内接種した。

**マウスの免疫：**4週令のICR、BALB/cおよびddYマウスに、1 µgから50 µgのDNAを3週間隔で2・5回筋肉内接種した。各免疫から2週後に眼窩静脈から採血した。

**免疫マウスへの攻撃：**100・1,000 LD<sub>50</sub>のJEV北京3株を腹腔内接種し、21日間観察した。また、生残マウスから採血した。

**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の下に行った。

## C. 研究結果

**雌雄ICRマウスにおけるリポソームのアジュバント効果：**50 µgまたは5 µgのpcJEMEを用いて、DNA単独またはリポソームと調合して、各グループ6・7匹の雄あるいは雌ICRマウスに3週間隔で3回、筋肉内接種した。コントロールとして50 µgのベクタープラスミドpcDNA3にリポソームを調合したものを1グループ設けた。JEVAX接種グループは3週間隔で3回、1/64 ドーズの

JEVAXを腹腔内接種した。各免疫から2週間後に採血を行い、中和抗体価を測定した（表1）。雄マウスではリポソームを加えることにより、pcJEMEの誘導する中和抗体価の上昇が認められ、リポソームの中和抗体誘導能増強効果が示された。50 µgのpcJEME単独接種が誘導する中和抗体価は、5 µgのpcJEMEをリポソームと調合して接種したマウスに誘導される中和抗体価と同等であり、リポソームとの調合により同等の中和抗体価を誘導するために接種DNA量を1/10に低減可能であることを示す。しかし、雌マウスにおいては、50 µgおよび5 µgの条件の下ではリポソームを加えることによる中和抗体価の上昇は認められず、リポソームのアジュバント効果は認められなかった。

JEVAXの国家検定に用いられる1/64ドーズにより免疫したICRマウスに誘導された中和抗体価と比較した結果、雄においてはリポソームと調合した場合、また雌においては調合しない場合に、50 µgのpcJEME接種により得られた中和抗体価と同等であった。

**雌 BALB/c マウスにおけるリポソームのアジュバント効果：**ICR マウスにおいてリポソームの効果に性差が認められた。そこで、昨年雄においてアジュバント効果が認められた BALB/c 系統の雌を用いて、リポソームの有無による中和抗体価を比較した。10 µg または 1 µg の pcJEME を用いて、DNA 単独またはリポソームと調合して、各グループ 10・11 匹の 4 週令の雌 BALB/c マウスに 3 週間隔で 5 回筋肉内接種した。各免疫から 2 週間後に採血を行い、中和抗体価を測定した（表 2）。10 µg または 1 µg の pcJEME により免疫した雌 BALB/c マウスに誘導される中和抗体価は低く、4 回接種まで中和抗体は検出されなかった。また、10 µg の pcJEME を 5 回接種したグループに 1:10 の中和抗体価が検出されたが、その他のグループでは 1:10 未満であった。この結果は、雌 BALB/c マウスにおいて、今回の条件の下でリポソームは中和抗体の誘導を促進しないことを示す。

**雌 ddY マウスにおけるリポソームのアジュバント効果：**リポソームと調合した pcJEME の中和抗体誘導能をさらに調べる

ために、JEVAX国家検定に使用されている雌ddYマウスを用いた。50 µgまたは5 µgのpcJEMEを用いて、DNA単独またはリポソームと調合して、各グループ6-7匹の4週令の雌ddYマウスに3週間隔で2回、筋肉内接種した。各免疫から2週間後に採血を行い、中和抗体価を測定した。また、JEVAX接種群は、上記の接種プロトコルのほか、国家検定のプロトコルで誘導される中和抗体価と比較するために1週間隔で2回、1/64ドーズのJEVAXを腹腔内接種し、2回目の免疫から1週間後に採血を行った。初回免疫から6週間後に1,000 LD<sub>50</sub>のJEV北京3株で攻撃し、21日間生存状況を観察するとともに、生残マウスから採血を行い、中和抗体価を測定した(表3)。JEVAXを1週間隔で2回接種したグループにおいて中和抗体価は1:10であり、3週間隔で2回接種したグループの中和抗体価(1:20)と同等であった。JEVAXを3週間隔で2回接種することにより誘導された中和抗体価(1:20)は、50 µgのpcJEMEを単独で2回接種したグループにおいて得られた中和抗体価(1:40)と同等であり、この接種プロトコルの下では、1/64ドーズのJEVAXと50 µgのpcJEMEが相当したことになる。また、リポソームを調合することにより、雌ddYマウスにおけるpcJEMEの中和抗体誘導能はむしろ阻害された。中和抗体誘導に与えるリポソームの効果はマウスの性に依存することが示された。

#### D. 考察

液性免疫の誘導にはDNAワクチンよりもタンパクワクチンが優れていると一般的に考えられている。これまで、DNAワクチンの液性免疫誘導能を促進するために、種々の工夫が報告されきた。細胞内への遺伝子の取り込みを促進する工夫、細胞内で遺伝子発現率を高める工夫、宿主の免疫応答を促進する工夫などである。アジュバントは、これらの工夫の1つである。そして、陽イオン脂質は、アジュバントの中で多くの利点を有する。すなわち、高い精製度で大量生産することが容易であり、動物やヒトに対して安全に投与できることが証明されている。今回用いたリポソーム試薬は、陽イオン脂質と中性脂質を1:1のモル比で

混合したものである。

雄BALB/c、ICRマウスにおいてリポソームが中和抗体の誘導を促進したのに対し、雌BALB/c、ddY、ICRマウスのいずれの系統においても今回の条件においては促進が認められなかった。リポソームのアジュバント効果における性差は、我々の知る限りにおいては報告がなく、その機構は不明である。陽イオン脂質と中性脂質のモル比、またリポソームとDNAの調合比率などにおいて、今後改良が必要と思われる。

遺伝子導入型ワクチンであるpcJEMEは、蛋白導入型ワクチンであるJEVAXと免疫誘導の機構が根本的に異なり、JEVAXの国家検定で用いられる免疫計画と比較することは困難である。他の研究室においても日本脳炎に対する試作DNAワクチンをJEVAXと比較する際、3週以上の間隔を空けて投与し、DNAワクチンの100 µgが、JEVAXの1/5ドーズと同等の中和抗体価を誘導したという結論を導いている。本研究において、国家検定に準じてddY系統の雌マウスにJEVAXを1週間隔で投与して得られた中和抗体価は、3週間隔で得られた中和抗体価と同等であった。そして、50 µgのpcJEMEが1/64ドーズのJEVAXと同等の中和抗体誘導能であった。これらの結果から、最初の免疫から6-9週間で比較すると、DNAワクチンの中和抗体誘導能はJEVAXに比して低いと考えられる。しかし、我々のDNAワクチンに類似のDNAワクチンが、JEVAXより持続期間の長いことが示されており、最初の免疫から比較的長期間の後にはDNAワクチンの方がJEVAXより高い中和抗体誘導能を示すことが考えられる。一般的に、持続期間の長いことはDNAワクチンの特徴であり、JEVAXの現行の国家検定法では評価できない点である。

#### E. 結論

リポソーム試薬は、日本脳炎DNAワクチンの中和抗体誘導能を促進する有望なアジュバントと考えられるが、アジュバント効果は条件により性差を生じることが明らかにされた。

#### F. 健康危険情報

特記すべき事項なし。