

G. 研究発表

1. 論文発表

Konishi E. and Fujii A.: Dengue type 2 virus subviral extracellular particles produced by a stably transfected mammalian cell line and their evaluation for a subunit vaccine. *Vaccine* 20, 1058-1067 (2002)

2. 学会発表

Konishi E. and Fujii A., and Kurane I.: Dengue type 2 virus subviral extracellular particles produced by a stably transfected mammalian cell line and their evaluation for a subunit vaccine. The 35th Joint Viral Diseases Panel Meeting US-Japan Cooperative Medical Science Program. Hawaii (2001).

Konishi E.: DNA Vaccines Against Japanese Encephalitis and Dengue. The

10th International Congress on Infectious Diseases. Singapore(2002).

奴久妻智代子、網代直子、小西英二：Vaxfectinによる日本脳炎DNAワクチンの中和抗体誘導能促進。第49回日本ウイルス学会学術集会・総会（2001）。

鈴木智之、奴久妻智代子、小西英二：日本人における日本脳炎ウイルス不顕性感染率の推定。第49回日本ウイルス学会学術集会・総会（2001）。

小西英二：日本脳炎DNAワクチン：はたして実用化されうるのか？ 第49回日本ウイルス学会学術集会・総会（2001）。

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

該当なし

表1 pcJEMEの中和抗体誘導能に及ぼすリポソームの効果：雌雄ICRマウスを用いた実験

性	免疫原 ^a	投与経路	ドーズ	リポソーム ^a	中和抗体価 ^b		
					1回免疫	2回免疫	3回免疫
雄	pcJEME	筋肉内	50 µg	+	<1:10	1:20	1:160
	pcJEME	筋肉内	50 µg	-	<1:10	1:10	1:20
	pcJEME	筋肉内	5 µg	+	<1:10	1:10	1:20
	pcJEME	筋肉内	5 µg	-	<1:10	<1:10	<1:10
	pcDNA3	筋肉内	50 µg	+	<1:10	<1:10	<1:10
	JEVAX	腹腔内	1/64 dose	-	<1:10	1:10	1:160
雌	pcJEME	筋肉内	50 µg	+	<1:10	1:10	1:40
	pcJEME	筋肉内	50 µg	-	<1:10	1:10	1:80
	pcJEME	筋肉内	5 µg	+	<1:10	<1:10	1:10
	pcJEME	筋肉内	5 µg	-	<1:10	<1:10	<1:10
	pcDNA3	筋肉内	50 µg	+	<1:10	<1:10	<1:10
	JEVAX	腹腔内	1/64 dose	-	<1:10	<1:10	1:80

^a 免疫原は、リポソームと調合して (+) 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%プラーク減少法により中和試験を行った。

表 2 pcJEME の中和抗体誘導能に及ぼすリポソームの効果：雌 BALB/c マウスを用いた実験

免疫原 ^a	投与経路	ドーズ	リポ ソーム ^a	中和抗体価 ^b			生存率 ^d
				攻撃前		攻撃後 ^c	
				1-4 回免疫	5 回免疫		
pcJEME	筋肉内	10 µg	+	<1:10	<1:10	1:160	45 (5/11)
pcJEME	筋肉内	10 µg	-	<1:10	1:10	1:640	100 (10/10)
pcJEME	筋肉内	1 µg	+	<1:10	<1:10	1:160	27 (3/11)
pcJEME	筋肉内	1 µg	-	<1:10	<1:10	1:20	18 (2/11)
pcDNA3	筋肉内	10 µg	+	<1:10	<1:10	1:640	10 (1/10)

^a 免疫原は、リポソームと調合して (+) 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%プラーク減少法により中和試験を行った。

^c 100 LD₅₀ の北京 P3 株により攻撃した。

^d 括弧内は生存数/総数。

表 3 pcJEME の中和抗体誘導能に及ぼすリボソームの効果：雌 ddY マウスを用いた実験

免疫原 ^a	投与経路	ドーズ	リボ ソーム ^a	中和抗体価 ^b		攻撃後 ^c	生存率 ^d
				攻撃前			
				1回免疫	2回免疫		
pcJEME	筋肉内	50 µg	+	<1:10	<1:10	1:640	50% (3/6)
pcJEME	筋肉内	50 µg	-	<1:10	1:40	1:1280	83% (5/6)
pcJEME	筋肉内	5 µg	+	<1:10	<1:10	NA	0% (0/6)
pcJEME	筋肉内	5 µg	-	<1:10	<1:10	1:320	17% (1/6)
JEVAX ^e	腹腔内	1/64 dose	-	-	1:10	1:1280	71% (5/7)
JEVAX ^f	腹腔内	1/64 dose	-	<1:10	1:20	1:640	71% (5/7)

^a 免疫原は、リボソームと調合して (+) 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%プラーク減少法により中和試験を行った。

^c 1,000 LD₅₀ の北京 P3 株により攻撃した。

^d 括弧内は生存数/総数。

^e 国家試験のプロトコールに従い、1 週間隔で 2 回免疫し、2 回目の免疫から 1 週後に採血した。

^f DNA ワクチンの接種プロトコールに合わせ、3 週間隔で 2 回免疫し、2 回目の免疫から 3 週後に採血した。

別紙 5

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
Konishi E. and Fujii A	Dengue type 2 virus subviral extracellular particles produced by a stably transfected mammalian cell line and their evaluation for a subunit vaccine	<i>Vaccine</i>	20	1058- 1067	2002

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
協力研究者 向井鏖三郎 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、既にマウスで有効性が確認されたワクチン候補プラスミドDNAを前回よりも増量してカニクイザルに接種し、抗JEV抗体の誘導を試みた。DNAワクチン接種により明らかに中和抗体および血球凝集抑制 (HI) 抗体が誘導されたが、抗体誘導の増強は認められなかった。また、病原ウイルス株による攻撃実験を行ったがワクチン接種による明確な感染防御効果を判定するには至らず、さらに免疫方法の改良および精度の高い実験が必要であると考えられた。

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に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、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昨年度に引き続き、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中山株の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出生、育成された年齢4歳（オス）カニクイザル9頭を用いた。

免疫方法

カニクイザル5頭にはPBSに溶解したプラスミドDNA pNJEME 500 μ gを大腿部筋肉内に投与した。4頭には対照としてベクターDNA 500 μ gを同様に接種した。初回免疫後、4および8週間後に、同量のプラスミドDNAを追加投与した。この間、経時的に血清抗体価を測定した。

ウイルス攻撃実験

最終免疫から3週間後にJaTH株を攻撃ウイルスとしてウイルス液0.25mlを両側に経鼻接種し、観察した。

抗JEV抗体の測定

血清抗体の測定はガチヨウ赤血球を用

いた血球凝集抑制試験(HI)により常法通り行った。また、ウイルス中和抗体価の測定は、PAP法により実施し、50%のプラーク数減少を示す被験血清の希釈倍数を抗体価とした。

(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. DNAワクチン接種後の抗体誘導
一回あたりに投与するDNA量を500 μ gに増量し、初回、4、8週目に3回筋肉内接種した。そのHI抗体価は表1に示すように、最終免疫後1週目(9週)で5頭中3頭に80倍から160倍のHI抗体価が認められた。また、ウイルス中和抗体は4頭で20倍から40倍の値を示した。pNJEMEを投与した1頭と対照DNA接種群4頭では抗体の上昇は認められなかった。

表1 DNA投与後の抗体価

サル No.	接種後の週			
	0w	8w	9w	11w
25	<	<	80 (40)	80
28	<	<	< (<)	<
29	<	<	80 (40)	80
22	<	<	160(40)	160
26	<	<	< (20)	40
21*	<	<	< (<)	<
23*	<	<	< (<)	<
24*	<	<	< (<)	<
27*	<	<	< (<)	<

* 対照DNA投与

()はウイルス中和抗体価

2. 攻撃実験

pNJEMEまたは対照DNAを投与したカニクイザルにJEV JaTH株を経鼻的に病原ウイルスを接種し、攻撃実験を行った。表2に示すように対照DNA免疫群のうちの1頭のサルが17日目に斃死したが、ワクチン投与群5頭および対照DNA投与群3頭は生残した。また、ウイルス接種にもかかわらず抗体価の上昇が認められない個体も存在した。これらの成績から、DNAワクチン接種と感染防御との関連性を明確に判定することは出来なかった。

表2 ウイルス攻撃後のHI抗体価と生死

サル No.	接種後の週				生死
	0w	2w	4w	6w	
25	80	320	320	160	生
28	<	<	<	<	生
29	80	160	160	80	生
22	160	160	160	160	生
26	40	320	160	80	生
21*	<	<	160	640	生
23*	<	<	<	<	生
24*	<	<	-	-	死
27*	<	<	160	160	生

* 対照DNA投与

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、JEVのMおよびE蛋白を発現するプラスミドDNAの投与量を増やしてカニクイザルを免疫した。抗JEV抗体の産生は認められたが、抗体価の明らかな増強は認められなかった。今後はアジュバントの添加や投与方法についての検討が必要である。また、病原ウイルス株による攻撃実験では、ウイ

ルス株を変更して行ったが、DNAワクチン免疫による抗体誘導と感染防御との明らかな関連性を判定しうる明確な結果は得られなかった。本研究では一定の年齢のカニクイザルを用いたにもかかわらずワクチン接種やウイルス接種で抗体を産生しない個体が存在し、攻撃ウイルス量の問題や実験用サル個体の要因なども考慮し、さらに精度の高い実験を行なうことが必要と考えられた。

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、投与量を増してカニクイザルにおける有効性試験を行ったが、抗JEV抗体の産生は認められたものの、免疫の増強および感染防御に関する明確な結論を得られなかった。

F. 研究発表

論文発表

Uda, A., Tanabayashi, K., Mukai, R., Yachi, M., Nam, K. H., and Yamada, A.: CD3 polymorphism in cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*). *J. Med. Primatol.* 30, 141-147, 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.* 50, 345-347, 2001.

Tanabayashi, K., Mukai, R., and Yamada, A. : Detection of B virus antibody in monkey sera using

glycoprotein D expressed in mammalian cells. *J. Clin. Microbiol.* 39, 3025-3030, 2001

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
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	30	141- 147	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.	50	345- 347	2001
Tanabayashi, K., Mukai, R., and Yamada, A.	Detection of B virus antibody in monkey sera using glycoprotein D expressed in mammalian cells.	J. Clin. Microbiol.	39	3025- 3030	2001

分担研究報告書

デングウイルス非構造蛋白遺伝子組込みプラスミドの作製とマウス防御実験

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 デングウイルス 2 型ニューギニア C (NGC) 株の細胞培養上清からウイルス RNA を抽出し、RT-PCR で非構造(NS) 蛋白遺伝子 NS1、NS2A、NS2B、NS2 (NS2A と NS2B)、NS4A、NS4B 及び NS4 (NS4A と NS4B) を増幅した。それぞれをベクター pcDNA3 に組込み、pcD2NS1 以下 7 種類のプラスミドを作製した。このうちの pcD2NS1、pcD2NS2 及び pcD2NS4 に加えて昨年度に報告した pcD2NS3 及び前駆膜 (prM) シグナル/prM/ 外被膜 (E) 遺伝子組込んだプラスミド pcD2ME を用い、単独投与または混合投与による防御免疫の誘導を検討した。今回用いた Yale 大学由来 DEN2 NGC 株は、すでに報告されている Irie らの NGC 株 (Gene, 1989) と比べ、NS1、NS2A 及び NS4A にアミノ酸レベルで 1 個所づつの変異がみられた。5 週令の雌 Balb/c マウスを 300ug の DNA により 2 週間隔で 3 回筋肉接種して免疫し、2 週後に、デングウイルス 2 型トリニダット TR1751 株を脳内接種することにより攻撃し、感染防御効果を調べた。その結果、prM 及び E 遺伝子を組込んだ pcD2ME により免疫したマウスが、脳内接種による攻撃から防御されることが明かとなった。しかし、種々の NS 遺伝子を組込んだプラスミドには、今回の攻撃条件に対する防御効果は認められなかった。対照としてトリニダット株を腹腔免疫したマウスはすべて生残し、ベクター pcDNA3 免疫マウスは攻撃後 2 週目までにすべて死亡した。これらの結果は、中和抗体を誘導する pcD2ME が、CTL を誘導すると考えられる他のプラスミドより脳内攻撃に対してより高い防御効果を持っていたことを示す。

A. 研究目的

病原体の遺伝子そのものを宿主体内で発現させる DNA ワクチンは、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、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、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、同時に JEV 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。

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。

デング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 (NS) 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。しかしながら、すでに行なった 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。

そこで前回、すでに cDNA が入手出来ていた NS3 と NS5 を用いて作製した組込みプラスミド pcD2NS3 と pcD2NS5 を pcD2ME と組合わせてマウスにおける免疫原性と防御効果を予備的に検討したが、明確な防御効果

をみることは出来なかった。

今回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、ウイルス培養液から RT-PCR によって増幅した DNA を用いて組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マウスにおける DNA ワクチンとしての防御効果を検討す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。NGC 株は Yale 大学由来で C6/36 細胞で、トリニダット株はマウスの脳内で継代されたものを用いた。

NS 遺伝子の増幅：Yale 大学由来 NGC 株の細胞培養上清から Qiagen 社の QIAamp Viral RNA Mini spin kit を使用して RNA を抽出し、ランダムプライマー、逆転写酵素、MuLV キット(アマシャム社)を用いて cDNA を得た。NS1、NS2、NS2A、NS2B、NS4、NS4A 及び NS4B 遺伝子は各々 2 種類のプライマーを用意し、Ready-To-Go PCR Beads(アマシャム社)を用いて PCR を 25 サイクルで行ない増幅した。NS1 のセンスプライマーは、NS1 の 5' 末端に開始コドン ATG、eukaryotic initiation site (ACC) 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。これに対して NS2、NS2A、NS2B、NS4、NS4A 及び NS4B の 6 種の遺伝子増殖用のセンスプライマーの切り出し用には Eco RI を付加した。アンチセンスプライマーは、7 種類の NS 遺伝子コード領域のそれぞれの 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。

プラスミド：増幅した遺伝子は QIAquick PCR Purification Kit(Qiagen 社)を用いて精製した。NS2 と NS4 は 1%アガロース L で泳動、切り出し後、同様に精製した。増幅された NS1 遺伝子は、市販の pcDNA3 ベクター (Invitrogen) の Eco RV/Xba I サイトに挿入してプラスミド pcD2NS1 を作製した。一方、NS2、NS2A、NS2B、NS4、NS4A 及び NS4B の 6 種の遺伝子は、pcDNA3 の Eco RI/Xba I サイトに組込んで各々のプラスミドを作製した。pcD2ME 及び pcD2NS3 は、すでに作製済みのプラスミドを使用した。

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」に詳述した。

作製したプラスミドは、大腸菌 DH5 (東洋紡) をコンピテント細胞に用いてトランスフォームさせた後、コロニーを単離し、2 x YT 培地で増殖させた。プラスミド DNA は、QIAfilter Plasmid Mega キット(Qiagen 社)を用いて精製し、1%アガロースゲル電気泳動及び分光光度計を用いた吸光度測定により定量した。

作製されたプラスミドの検定：作製されたプラスミド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、NS 遺伝子コード領域に読み間違いがないことは、ABI 社の BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit を用いて反応させ、ABI PRISM 310 Genetic Analyzer を用いたシーケンシングにより検討した。今回用いた Yale 大学由来の NGC 株の NS 遺伝子配列は、すでに報告されている Irie ら (Gene, 1989) のそれと比較して決定した。

マウスの免疫：雌 Balb/c マウスを 11 グループに分け、グループあたり 5 匹ずつ用いた。免疫原のデングウイルス遺伝子を組込んだプラスミドは、pcD2ME、pcD2NS1、pcD2NS2、pcD2NS4 と「デング DNA ワクチンの開発：マウスにおける脳内攻撃実験」(平成 12 年度の研究班分担研究報告書) に用いた pcD2NS3 及び陰性コントロールとして pcDNA3 ベクターを用いた。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 に NS 遺伝子組込みプラスミドを組合せて接種した。平成 12 年度に行なった pcD2ME、pcD2NS3、pcD2NS5 を用いたマウス免疫実験(分担研究報告書、表 1) では、NGC 株を 3 回マウス腹腔内に接種したグループは 3/5 が生残し、PBS あるいは pcDNA3 ベクター接種群はすべて死亡した。また生残した pcD2ME の #3 及び pcD2NS3 の #5 の中和抗体価は、160~320 倍以上に上昇し、中和抗体の有用性が示唆された。この時、プラスミドを 1 回あたり 100ug から 200、300ug へ増量するにつれて IF 抗体価は、10~40、10~160、20~160 倍以上へと上昇し、 9×10^6 pfu/shot の NGC 株を 3 回マウス腹腔内に接種したグループの抗体価に近付くこと、中和抗体価も 40 倍を示す個体が存在したことから、免疫原のプラスミドを増量し、1 回 300 ug を用いた。これらの免疫原を 5 週令マウ

スの尾根部に注射器を用いて筋肉内接種した。さらに 2 週間隔で 2 回針なし注射器、シマジェット（島津製作所）を用いて接種した。また、NGC 株は前回（表 1）と同様に 9×10^6 PFU/one shot で 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た。

防御免疫の誘導：11 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、トリニダット TR1751 株を脳内に 0.2 ml ずつ接種して攻撃した。攻撃ウイルスには表 1 で使用したものと異なる新たなロットを使用し、2000 倍希釈で 8/8 死亡、10 の 4 及び 5 乗希釈で 7/8 死亡、10 の 6 乗希釈で 3/8 死亡したことから 10 の 4 乗希釈（40LD₅₀ に相当）を選び攻撃した。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

プラスミドの作製及び検定：Yale 大学由来の Dengue virus 2 型 NGC 株の C6/36 細胞培養上清から RNA を抽出し、RT-PCR によって得られた NS1、NS2、NS2A、NS2B、NS4、NS4A 及び NS4B 遺伝子は、図 1 のとおり増幅された。各々の DNA フラグメントをベクター pcDNA3 に組み込んだ後、コンピテント細胞 DH5 にトランスフォームし、単離したコロニーを増殖して得られた精製プラスミドをシークエンスした。このとき、NS2A、NS2B にみられた変異と NS2 の変異が一致しない、PCR による読み間違いの存在が明らかになった。NGC 株のシークエンスは Irie らがすでに報告しているが、Yale 大学由来株は解析されていない。そこで各々のプラスミドについて複数のコロニーを拾い、各々のシークエンスを Irie らのシークエンスと比較することによって目的とするプラスミドを検定した。その結果、Yale 大学由来 NGC 株の NS1 遺伝子は Irie らの NGC 株とヌクレオチドで 2 箇所、NS2 及び NS4 に各々 3 箇所ずつの変異がみられ、各々の遺伝子に 1 箇所ずつアミノ酸の変異を伴っていた（表 2）。

免疫後のマウス防御効果：5 週令の Balb/c マウスに Dengue virus の遺伝子を組み込んだ 5 種類のプラスミド pcD2ME、pcD2NS1、pcD2NS2、pcD2NS3 及び pcD2NS4 を各々単独で、あるいは pcD2ME と種々の NS 遺伝子組み込みプラスミドを組合わせたグループ及び陽性、陰性コントロール

の合計 11 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 virus 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、各々のスコアをグループ毎に合計した値で示した（表 3）。免疫実験中に pcD2ME、pcD2NS3 及び pcD2NS4 の 1 匹づつは事故死した。トリニダット TR1751 株を腹腔免疫したマウスは攻撃後全例生残し、ベクターのみを接種したグループは 13 日めまでにすべて死亡した攻撃実験で、pcD2ME 単独接種で 3/4 が生残し、pcD2NS3 の 1 匹も生残ったが、pcD2NS1、pcD2NS2、及び pcD2NS4 を単独で接種したグループではマウスを救えなかった。一方、pcD2ME と種々の NS を組み込んだプラスミドを組合わせて免疫したグループでは、pcD2NS1 及び pcD2NS4 に各々 3/5 と 2/5 の生残マウスが存在した。pcD2ME、pcD2ME と pcD2NS1 及び pcD2ME と pcD2NS4 の組合わせで生残したマウスの中に接種後 11～15 日目に発症しながら回復したマウスがみられた。

D. 考察

Yale 大学由来の Dengue virus 2 型 NGC 株の C6/36 細胞培養上清から RT-PCR によって目的とする NS 遺伝子は増幅出来たが、クローン化するとヌクレオチドの 1、2 箇所に PCR による読み間違いと思われる変異がみられた。Yale 大由来株はシークエンスが解析されていないため、Irie らの報告と比較した結果、各々のプラスミドについて解析した複数のコロニーに共通してみられた差異は、Irie らの NGC 株との変異を示している。

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。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起こさず Dengue virus は存在しない。脳内接種法は腹腔接種と異なり CTL の機能する場所がない欠点を持つが、防御効果を病気の進行あるいは生死で明確に知ることができる脳内接種による攻撃実験を試みた。昨年の NS3 及び NS5 を使用した実験（平成 12 年度の研究班分担研究報告書）から免疫プラスミド量を増やすこと、NGC 株を腹腔接種したマウスは攻撃後全例生残し、ベクターのみを接種したグループはすべて死亡するように攻撃ウイルスの量を調節した。その結果、コントロール群で生死が分かれ、昨年の結果では明確

でなかった pcD2ME のワクチンとしての防御効果が明らかになったものと考えられる。しかし、腹腔接種で全例生残したのは、免疫と攻撃実験に使用したウイルスが NGC 株との抗原性の差異を考慮しなくていい同じデングウイルス 2 型トリニダット TR1751 株であった可能性もある。また、血中抗体を高める作用のある針なし注射器の有用性を示唆する論文 (Hartikka, J, et. al., Vaccine, 19, 2001) にならい、2、3 回目の接種はインシュリン注射用に開発されたスプリング式の針なし注射器、シマジェットを使用した。その結果、免疫反応が増強し、前回 (平成 12 年度の研究班分担研究報告書) と比べて pcD2ME 接種群の生残数が増加した可能性がある。今後、マウスにおける DNA ワクチンの免疫原性を高める目的で注射方法の検討をすすめる必要がある。

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 は、単独ではマウスを救えなかったが、pcD2ME と組み合わせることによって脳内接種からマウスを防御した。これまで防御効果が不明のままであった NS4 にも pcD2ME との組み合わせることによって一定の防御効果が示唆された。しかし、pcD2ME の側から見れば NS1 あるいは NS4 遺伝子は pcD2ME の機能を阻害する方向で作用しているともとれる。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、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デングにおいて DNA ワクチンはより有利な方法である。pcD2NS3 単独

免疫で生残したマウスも含めて CTL の誘導に焦点を当てた解析が必要である。

E. 結論

5 種類のプラスミドを用いてマウスを免疫後、脳内接種によって攻撃した結果、prM 及び E 遺伝子を組込んだ pcD2ME により免疫したマウスが、脳内接種による攻撃から防御されることが明かとなった。しかし、他の領域の遺伝子には、今回の攻撃条件に対する防御効果は認められなかった。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

特になし。

2. 学会発表

特になし。

H. 知的財産権の出願・登録状況

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免疫の誘導^a

免疫原	投与量 ^b	投与経路	IF抗体価 ^c / 中和抗体価					#6
			#1	#2	#3	#4	#5	
pcD2ME	100ug	i.m.	20	40	40	20	40	#3 ^f
			10	10	10	10	10	
pcD2NS3	100ug	i.m.	10	20	20	20	10	
			<10	<10	<10	<10	<10	
pcD2NS5	100ug	i.m.	10	20	20	20	10	
			<10	<10	<10	<10	<10	
pcD2ME+NS3	100ug+100ug	i.m.	10	10	40	80	160	#5 ^f
			10	10	10	10	40	
pcD2ME+NS5	100ug+100ug	i.m.	40	160	160	40	20	
			10	40	10	10	10	
pcD2ME+NS3+NS5	100ug+100ug+100ug	i.m.	160 \leq	40	20	80	160 \leq	
			10	10	10	10	10	
pcDNA3	100ug	i.m.	<10	<10	<10	<10	<10	
			<10	<10	<10	<10	<10	
PBS		i.m.	<10 ^d					
			NT					
DEN2NGC ^e	9x10 ⁶ PFU	i.p.	160 \leq	80	160 \leq	160 \leq	160 \leq	40
			80	40	40	40	80	

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

f 生残マウスの中和抗体価

Marker
NS1
NS2A
NS2B
NS2
NS4A
NS4B
NS4

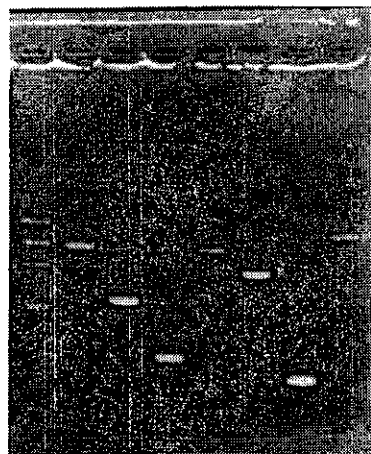


図1 デングウイルス2型NGC株のC6/36細胞培養液からPR-PCRによるNS遺伝子の増幅

表2 Yale大学由来NGC株のNS遺伝子とIrieら(Gene 75,1989)との比較

遺伝子	変異数		
	ヌクレオチド	アミノ酸	変異アミノ酸
NS1	2	1	Q→R
NS2	3	1	F→L
NS2A	2	1	F→L
NS2B	1	0	
NS4	3	1	F→L
NS4A	3	1	F→L
NS4B	0	0	

表3 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	投与量	投与経路	攻撃後の日数																			
			0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
pcD2ME	300ug	i.m.	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	10	8	8	9	9	9	9	9
pcD2NS1	300ug	i.m.	15	15	15	15	15	15	15	15	11	4	2	2	2	0	0	0	0	0	0	0
pcD2NS2	300ug	i.m.	15	15	15	15	15	15	15	15	7	6	5	4	2	1	1	0	0	0	0	0
pcD2NS3	300ug	i.m.	12	12	12	12	12	12	12	12	12	11	11	10	7	4	4	3	3	3	3	3
pcD2NS4	300ug	i.m.	12	12	12	12	12	12	12	12	8	6	6	4	2	0	0	0	0	0	0	0
pcD2ME+NS1	300ug+300ug	i.m.	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	13	11	9	8	8	9	9	9	9
pcD2ME+NS2	300ug+300ug	i.m.	15	15	15	15	15	15	15	15	13	11	9	6	4	0	0	0	0	0	0	0
pcD2ME+NS3	300ug+300ug	i.m.	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	10	6	1	0	0	0	0	0	0
pcD2ME+NS4	300ug+300ug	i.m.	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	11	8	5	7	7	6	6	6	6
pcDNA3	300ug	i.m.	15	15	15	15	15	15	15	15	14	12	10	10	7	2	0	0	0	0	0	0
DEN2Trinidad ^b	9x10 ⁶ PFU	i.p.	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15

^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週目にデングウイルス2型トリニダットTR1751株を脳内に0.2mlづ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trinidadTR1751株

厚生科学研究費補助金（厚生労働省新興再興感染症研究事業）

分担 研究報告書

西ナイルウイルス致死的感染に対する日本脳炎抗体による交叉防御の検討と
沖縄県住民の西ナイルウイルス交叉中和抗体保有状況の調査

分担研究者 只野昌之（琉球大学医学部ウイルス学）

共同研究者 加根村和美、馬 紹平（琉球大学医学部ウイルス学）

新川 武（琉球大学遺伝子実験センター）

研究要旨

マウスを用いた実験で、日本脳炎 (JE) ワクチンによる免疫および JE 抗体を含むヒト血清の硫酸分画による受動免疫は致死的な西ナイルウイルス (WNV) 脳内接種 ($10LD_{50}$) からマウスをプロテクトした。また、JE ワクチンで免疫されたマウスは致死的な WNV 腹腔内接種 ($200LD_{50}$) からマウスをプロテクトした。日本脳炎ウイルス (JEV) の侵淫度が異なる沖縄県の二島で住民から得られた血清について JEV (沖縄分離株) と WNV (Eg101 株) に対する中和抗体が測定された。JEV の高侵淫地域である沖縄本島に居住する住民は 52.6% が WNV を交叉中和する抗体を保有していたが、低侵淫地である石垣島に居住する住民は 18.5% しか保有していなかった。

A. 研究目的

WNV はアフリカ、地中海沿岸、中東、インドなど広い地域に分布するが、南北アメリカ大陸には存在しないとされていた。しかし、1999 年に米国ニューヨーク州で WNV による脳炎が流行し、米国内のみならず世界的にも注目された。我が国にも WNV に感受性のある鳥類や媒介蚊が生息していることから、ウイルスが侵入すれば、米国と同様に WNV 感染症が流行するのではないかと危惧される。本ウイルスに対するワクチンは無いが、JEV と同じ抗原グループに属し、抗原性が近いことから JEV に対する免疫

が WNV の感染あるいは発症を防御するのではないかと期待される。我が国は JEV の常在地で、一部の地域ではブタとコガタアカイエカの間で JEV が循環しており、住民への自然感染も起きていると考えられる。さらに、住民の多くは JE ワクチンの接種による抗原刺激を受けている。JEV 抗原に対する免疫が WNV 感染に交叉防御に働くなら、日本に WNV が侵入しても米国における流行とは異なった様相をとると推測される。サルを使った実験で、JEV の感染免疫が WNV による致死的感染を防御したという報告があるが、現行の不活化 JE ワクチンに

よる免疫の交叉防御は検討されていない。また、ワクチンや自然感染で免疫されたヒトに対して WNV に対する防御効果があるかについても不明である。我々が沖縄県で行った JEV の疫学的・生態学的調査で、沖縄本島では JEV が豚と蚊の間で活発に循環していることが示されている。このことから、沖縄本島住民はワクチンによる JE 抗原刺激以外に、JEV の自然感染による免疫誘導も受けていると考えられる。一方、石垣島の調査では媒介蚊が多数生息しているにもかかわらず、豚の JE 抗体は調査期間を通して検出されなかった。このことから、石垣島ではウイルスが殆ど循環しておらず、住民の保有する JE 抗体は、殆どがワクチンで誘導されたと推測される。JE ワクチン接種で誘導された JE 抗体を主に保有する集団とワクチン免疫に加えて自然感染による免疫誘導も受けていると考えられる集団の WNV に対する交叉中和の態度を知り、それらを比較することは興味深い。

本研究では現行の不活化 JE ワクチンあるいは JE 抗体を含むヒト血清の硫酸分画で免疫したマウスに WNV を接種して交叉防御を試験的に検討した。さらに、JEV の浸淫度が異なる沖縄島と石垣島の住民血清について、WNV に対する交叉中和抗体の測定も行った。

B. 研究方法

ウイルスと細胞：JEV 沖縄分離株

(C307)と WNV(Eg101)はヒトスジシマカ由来 C6/36 細胞で増殖させ、その感染培養上清を分注して中和試験に供するまで -70°C に保存した。ハムスター腎由来 BHK-21 細胞は 10%ウシ胎児血清(FBS)を含むイーグル最少必須培地(10F-EMEM)を用いて 37°C で培養した。C6/36 細胞は 10F-EMEM に非必須アミノ酸を添加した培地を用いて 28°C で培養した。

ウイルスの定量と中和試験：JEVとWNVは96穴マイクロプレートに培養したBHK-21細胞を用いたフォーカス法で感染価(focus forming unit; ffu/ml)を測定した。被検血清のJEVおよびWNVに対する中和抗体価は50%フォーカス減少法で測定した。WNVはフォーカス法による感染価測定に加えて、マウス脳内接種によって致死量(LD50)も測定した。

ヒト血清のガンマグロブリン分画の調整：WNV常在地への渡航歴のない研究室内のボランティアの血清(表-1)から、JE中和抗体価の高い血清をガンマグロブリン分画の精製に用いた。血清1容量に0.33容量の飽和硫酸アンモニウム溶液を加えてガンマグロブリン分画(抗体成分の多い分画)を沈殿せしめ、この沈殿を元の血清材料の半量のリン酸緩衝食塩溶液(PBS)で溶解し、PBS中で透析して硫酸アンモニウムを取り除き、使用するまで -20°C に保存した。

マウスの免疫とWNV接種実験：阪大微生物病研究会から分与された濃縮

不活化 JE ワクチン（北京—1 株由来、1999 年 2 月 4 日製造、製造番号：CPW98003、蛋白濃度：96.5 μ g/ml）を PBS で希釈し（蛋白濃度：253ng/ml）、マウス（ddy、メス、4 週齢）の腹腔に 0.5ml ずつ 1 週間隔で 2 回接種した。それらのマウスは、最後の接種の 1 週間後にウイルスチャレンジに供した。上記のガンマグロブリン分画溶液をマウス（ddy、メス、6 週齢）の腹腔内に 0.5ml ずつ注射した。これらの受動免疫されたマウスは、ガンマグロブリンの注射から 2 日後にウイルス接種に供した。

上記の能動免疫および受動免疫した二群のマウス（各々 5 匹ずつ）は WNV (10LD50/mouse) を脳内接種した。また、能動免疫された別のマウス群（4 匹）は WNV (200LD50/mouse) を腹腔内接種した。これら三群のマウスはウイルスチャレンジ後、生死を 4 週間観察した。各々の接種ルートで非免疫群のマウスについても、対照群として WNV を接種した。これらマウスへの WNV 接種実験は琉球大学・医学部・附属動物実験施設の P3 実験室でビニールアイソレーターを用いて行った。沖縄県住民の血清：1989 年および 1990 年に 156 名の沖縄本島住民および 184 名の石垣島住民から採血された血清が JEV および WNV の中和抗体測定に用いられた。両島の供血者 0 歳から 51 歳以上の年齢層で構成されていた。

（倫理面への配慮）

研究者本人あるいは共同研究者からえられた血清がマウス受動免疫実験に用いられた。また、血清疫学的調査に用いられた沖縄県住民の血清は本研究で用いられた血清は 1989 年および 1990 年に沖縄本島及び石垣島で日本脳炎ウイルスの疫学調査を目的に集められたもので、講座内で保管されていたものを用いた。また、マウスを用いた実験は大学内の動物実験委員会から承認を受けて行われた。

C. 研究結果

ボランティア血清の JEV および WNV に対する中和抗体価測定

表 1. に見られるように、JEV に対する中和抗体を有するボランティア血清の一部には WNV を交叉中和するものがあつた。特に供血者 A の血清は、用いた血清の中で最も強く JEV をちゅうわした。さらに血清 A は WNV に対して弱い中和活性も示した。マウスの受動免疫に用いるヒトガンマグロブリン分画の精製にこの血清が用いられた。

免疫マウスへの WNV 攻撃試験

高力価 JE 中和抗体を含むヒトガンマグロブリン分画（血清 1ml 相当）で受動免疫されたマウス群と不活化 JE ワクチンで能動免疫されたマウス群および非免疫マウス群、それぞれ 5 匹ずつについて 10LD50 の WNV を脳内接種して生死を 4 週間観察した。図-1 に示したように、非免疫群のマウスはウイルス接種から 6 日目に 3 匹

が死亡し、残りの2匹は9日目と10日目にそれぞれ1匹ずつが死亡した。ところが、高力価 JE 抗体含有ヒトガンマグロブリンを受動免疫したマウス群ではウイルス接種後9日目と10日目にそれぞれ1匹ずつが死亡したが、4週間の観察で3匹が生残した。さらに、不活化 JE ワクチンで免疫したマウス群ではウイルス接種後10日目に1匹が死亡したのみで、4匹が生残した(図1)。

つぎに、不活化 JE ワクチンで能動免疫されたマウスが WNV による末梢からの攻撃に対して防御されるか否かについての検討が行われた。免疫された4匹のマウスと3匹の非免疫マウスは200LD50のWNVを腹腔から接種された。非免疫マウス群はウイルス接種後10日目に2匹、13日目に残りの1匹が死亡した。しかし、ワクチン免疫群ではウイルス接種後9日目と10日目にそれぞれ1匹ずつが死亡したが、残りの2匹は生残した(図2)。

沖縄県住民の JEV 中和抗体および WNV 交叉中和抗体保有率

沖縄本島住民と石垣島住民から採血された血清材料について、JEV と WNV に対する中和試験の結果が表2に示されている。沖縄本島住民血清の96.2%と石垣島住民血清の56.0%に JEV 中和抗体が検出された。一方、WNV に対する交叉中和抗体は沖縄本島住民血清の52.6%、および石垣住民血清の18.5%から検出された。JE 中和抗体が検出されず、WNV 交叉中和抗体が検出

される検体は無かった。JE 中和抗体検出された検体の内、WNV 交叉中和抗体が検出される割合は、沖縄本島住民血清が54.7%で、石垣島住民血清が33.0%だった。

年齢階層別解析

上述の中和試験の結果が年齢階層別に解析された。図3に示したように、沖縄本島住民は何れの年齢層でも90%以上が JEV 中和抗体を保有していた。さらに、WNV に対する交叉中和抗体保有率は0歳から50歳までのグループは40%以上であったが、51歳以上のグループは JEV 中和抗体陽性率が100%であるにもかかわらず、WNV を中和したのは20%にすぎなかった。一方、石垣島住民は6歳から30歳までのグループの60%以上が JEV 中和抗体を保有していたが、5歳以下のグループの JEV 中和抗体保有率は40%であった。また、31歳から40歳のグループの JEV 中和抗体保有率は20%と低かったが、その率は加齢に伴って増加し、51歳以上のグループでは50%以上あった。石垣島住民の年齢階層別 WNV 交叉中和抗体保有率は JEV 中和抗体保有率のパターンに類似したが、30%を越える年齢層はなかった(図4)。

JEV および WNV に対する中和抗体価の相関

沖縄本島および石垣島住民から採血された血清検体の JEV および WNV に対する各々の中和抗体価が regression analysis された(図5および図6)。JEV 中和抗体と WNV 交叉