

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
Tanabayashi, <u>K.</u> , Mukai R., Yamada, A., Takasaki, T., Kurane, I., Yamaoka, M., Terazawa, A., and Konishi, E.	Immunogenicity of a Japanese encephalitis DNA vaccine candidate in cynomolgus monkeys.	Vaccine			印刷中
Uda, A., Tanabayashi, <u>K.</u> , Mukai, R., Terao, K., and Yamada, A.	Identification of an amino acid responsible for the CD3 polymorphism in cynomolgus monkeys (<i>Macaca fascicularis</i>).	J. Med. Primatol.			印刷中

日本脳炎及びデング DNA ワクチンの中和抗体誘導能を増強する針無し注射器接種法

分担研究者 山岡政興(兵庫県立健康環境科学研究所)

共同研究者 小西英二(神戸大学医学部医療基礎学講座)

寺澤文(神戸大学医学部医療基礎学講座)

研究要旨 バネ式の針無し圧力注射器を用いて日本脳炎ワクチン pcJEME 及びデング DNA ワクチン pcD2ME のマウスにおける免疫誘導能の増強効果を調べた。4 から 5 週令の雄または雌 ICR または ddY マウスに、5 から 6 匹を 1 群として、100 μ g の DNA を 2 週間隔で 2 から 3 回接種した。DNA ワクチンは針付き注射器で大腿部に筋肉内投与、あるいは針無し注射器で大腿部の皮膚の上から投与した。各々の免疫から 2 週後に採血しプール血清を作製した。pcJEME 接種実験では中和抗体価は 2 回免疫後針付き接種群で雌雄とも 1:20 であったのに対して、針無し注射群では雌及び雄において 1:40 及び 1:80 であった。ELISA の結果も同様に、針無し注射群に高い抗体値が示された。pcD2ME 接種実験では 1 回免疫後に針無し接種群に中和抗体が出現した。以後 3 回の採血ではすべて針付き接種法に比べて高い中和抗体が出現し、最大 16 倍の増強効果を認めた。さらに、pcJEME 接種実験では 2 回目の免疫から 3 週後に腹腔内攻撃し、より高い防御効果を認めた。以上の結果は、マウスにおいて針無し注射器を用いた接種により日本脳炎及びデング 2 型 DNA ワクチンの中和抗体及び防御免疫誘導能が増強したことを示す。

A. 研究目的

DNA ワクチンは、種々の利点を持つ新たな手法として有望視されている。しかし一般的に中和抗体誘導能は低い傾向にある。一方、日本脳炎 (JE) 及びデングウイルス感染症の感染防御には、中和抗体が重要な役割を果たしており、我々は DNA ワクチンの中和抗体誘導能を高めるための模索を行ってきた。

今回、針無し注射器を使用した接種法が、日本脳炎及びデングの DNA ワクチンに対する中和抗体誘導能に及ぼす効果についてマウスを用いて調べることを目的とした。

B. 研究方法

ウイルス：JE ウイルス中山株をプラスミドの作製及び中和試験に、北京 P3 株を攻撃実験に用いた。デングウイルス 1 型望月株を、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攻撃ウイルスとして使用した。また、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。

プラスミド：日本脳炎ワクチンとしては、市販の pcDNA3 ベクター (Invitrogen) に JE ウイルス、中山株のシグナル/prM/E 遺伝子を組込んだプラスミド pcJEME を用いた。デングワクチンとしては、デングウイルス 2 型ニューギニア C 株の同遺伝子を組込んだ pcD2ME を用いた。作製法の詳細は平成 9 年度及び平成 10 年度の研究班分担研究報告書「日本脳炎 DNA ワクチンの作製」及び「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」に詳述した。プラスミド DNA は、それぞれトランスフォームさせた大腸菌 DH5 (東洋紡) を 2xYT 培地で増殖させた後 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。

針無し注射器：バネ式の針無し圧力注射器シマジェット (U-100、インスリン用：島津製作所) を使用した。

マウスの免疫：(1) pcJEME の免疫：5 週令の雄及び雌 ICR マウスのそれぞれ 5

匹を1群として、100 μ gのプラスミドDNAを3週間隔で2回接種した。注射針付き注射器でマウスの大腿部に筋肉内投与、あるいは針無し注射器で大腿部の皮膚の上から投与した。投与はいずれも左右の大腿部に半量づつ投与した。それぞれの免疫から2週後に眼窩静脈叢より採血してプール血清を作製し、抗体測定に供した。

(2) pcD2MEの免疫：5週令の雄 ddY マウスの6匹を1群として、100 μ gのプラスミドDNAを3週間隔で2回接種した。接種は針付き注射器及び針無し注射器を用い、それぞれの免疫から2週後に採血した。さらにその後、3週ごとに2回(最終16週令)採血し、プール血清を作製し、抗体測定に供した。

マウスの攻撃実験：pcJEME免疫マウスにおいては、2回目の免疫から3週後に致死量(50,000LD₅₀)のJEウイルス北京P3株の腹腔内接種により攻撃し、21日間生死を観察した。

抗体測定法：ELISA法または90%プラーク減少法による中和試験を用いた。

C. 研究結果

pcJEME接種実験：100 μ gのpcJEMEを2週間隔で2回ICRマウスの大腿部に接種し、ELISA抗体、中和抗体及び攻撃後の防御効果について調べた(表1)。その結果、中和抗体価は1回免疫後には検出されなかった(<1:10)が、2回免疫後には針付き注射器接種群では雌雄とも1:20であったのに対して、針無し注射器接種群では、雌及び雄においてそれぞれ1:40及び1:80の中和抗体価が誘導された。ELISA抗体の結果も中和抗体の結果と一致しており、針無し注射器接種群に高い抗体価が示された。抗体誘導能における雌雄差は、針付き、針無しいずれの場合も雌に比べて雄の方が高かった。2回免疫3週後に北京P3株で攻撃後、針付き注射器接種群では、雌雄合計で10匹中9匹が生残し、針無し注射器接種群では全数が生残した。これに対して、対照のpcDNA3接種群(針無し注射器投与)は、10匹中9匹が死亡し、針付き、針無しいずれの接種群とも有意に高い生存率を示した(P<0.01)。

pcD2ME接種実験：100 μ gのpcD2MEを2週間隔で2回、雄 ddY マウスに接種し、初回免疫から3週毎の中和抗体誘導能を16週令まで4回採血し、調べた(表3)。その結果、中和抗体は針付き注射器接種群では1回免疫後検出されなかったが、2

回免疫2週間後1:20の抗体が出現した。それ以後3回目、4回目(16週令)採血で1:40、1:80へと上昇した。これに対して、針無し注射器接種群では1回免疫で1:10の中和抗体が検出され、2回免疫2週間後に1:320に上昇した。3回採血時(13週令)にその抗体価は持続し、16週令における4回目の採血ではふたたび上昇し、1:640に達した。

D. 考察

今回おこなった日本脳炎ワクチン(pcJEME)及びデングワクチン(pcD1ME、pcD2ME)のマウス接種実験の結果は、いずれも針無し注射器接種法が中和抗体誘導能を増強したことを示している。さらに日本脳炎ワクチン接種実験においては、雌よりも雄における抗体の誘導能が優れていることが示唆された。そこで以後のデングワクチン接種実験においては雄のマウスを使用することにした。

別に行ったpcD1ME接種実験においては3回免疫後の初めて中和抗体が出現したのに対して、今回のpcD2ME接種実験における針無し注射器接種群では1回免疫後中和抗体を検出した。同じデングウイルスにおいても型による、あるいは株による免疫原性の差異を強く示唆している。さらに、使用したマウスの系統がICRとddYで異なっていたことが抗体誘導能に差異をもたらした可能性もある。

pcD2ME接種実験では中和抗体価は、2回免疫後針付き注射器接種群では時間の経過とともに抗体は上昇し続けた。針無し注射器接種群においても中和抗体価は、2回免疫2週目に飛躍的に上昇後持続した抗体価は最終回の採血(16週令)で最大に達した。DNAワクチンが長期に亘って発現し続けることを示唆する。

日本脳炎ワクチンのマウスにおける防御効果の判定には、腹腔からの攻撃実験が可能であるために今回の接種実験においても、針付き接種群における1:20の中和抗体価があれば、マウスを致死量の攻撃から防御できる。一方、デングワクチン(pcD2ME)においてはワクチンの防御効果を評価するために我々は脳内接種法を用いてきた(平成12年度及び平成13年度の研究班分担研究報告書「デングDNAワクチンの開発：マウスにおける脳内攻撃実験」及び「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」)。脳内接種法は腹腔接種法に比べて、攻撃ウイルスが血中抗体と接

触する機会が限定される結果、血中抗体の効果を正確に評価できない恐れがある。それにもかかわらず、攻撃ウイルス量を適正に調整できたとき、デングウイルス2型 NGC 株で免疫したマウスはすべて脳内攻撃から防御された(平成 13 年度の研究班分担研究報告書「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」)。このとき pcD2ME 免疫マウスの防御効果は部分的であり、血中の中和抗体価は防御効果を反映するように NGC 株免疫マウスがプラスミド免疫マウスに比べて 4 倍から 8 倍高かった。今回の針無し注射器接種群では 2 回免疫後針付き接種群に比べて 8 倍から 16 倍の増強効果が認められたことから、pcD2ME の針無し注射器接種法によって脳内攻撃からの防御効果を高めることができる可能性を示唆する。

今回用いた針無し注射器は、ヒトのインスリン投与用に開発されたもので、マウスには圧力が高すぎたためか大腿部への投与によって部分的ではあったが出血等がみられ、改善の余地が示唆された。

E. 結論

pcJEME、pcD1ME 及び pcD2ME のマウス接種実験を行い、いずれの実験結果もマウスにおいて針無し注射器を用いた接種法により日本脳炎、デング 1 型及びデング 2 型 DNA ワクチンの中和抗体誘導能が

上昇したことを示す。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

Tanabayashi K., Mukai R., Yamada A., Takasaki T., Kurane I., Yamaoka M., Terasawa A. and Konishi E.,: Immunogenicity of a Japanese encephalitis DNA vaccine candidate in cynomolgus monkeys. Vaccine in press (2003).

2. 学会発表

山岡政興、小西英二：日本脳炎及びデング DNA ワクチンの中和抗体誘導能を増強する針無し注射器接種法。第 50 回日本ウイルス学会学術集会・総会 (2002)。

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 針無し注射器によるpcJEMEの免疫誘導能増強効果

免疫原	投与量	注射 針	性	ELISA抗体値		中和抗体価		生存率
				1回免疫 ^a	2回免疫 ^b	1回免疫	2回免疫	
pcJEME	100 ug	+ ^c	♂	0.049	0.656	<1:10	1:20	5/5
pcJEME	100 ug	+	♀	0.015	0.397	<1:10	1:20	4/5
pcJEME	100 ug	- ^d	♂	0.214	0.908	<1:10	1:80	5/5
pcJEME	100 ug	-	♀	0.111	0.768	<1:10	1:40	5/5
pcDNA3	100 ug	-	♂	0.000	0.002	<1:10	<1:10	0/5
pcDNA3	100 ug	-	♀	0.000	0.019	<1:10	<1:10	1/5

a 1回免疫2週後のプール血清

b 2回免疫2週後のプール血清

c 針付き注射器による接種

d 針無し注射器による接種

表2 針無し注射法によるpcD2MEの免疫誘導能増強効果

免疫原	投与量	注射 針	マウス週令と中和抗体価			
			7w ^a	10w ^b	13w ^c	16w ^d
pcD2ME	100 ug	+ ^e	<1:10	1:20	1:40	1:80
pcD2ME	100 ug	- ^f	1:10	1:320	1:320	1:640
pcDNA3	100 ug	-	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10

- a 1回免疫2週間後のプール血清
- b 2回免疫2週間後のプール血清
- c 2回免疫5週間後のプール血清
- d 2回免疫8週間後のプール血清
- e 針付き注射器による接種
- f 針無し注射器による接種

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
Tanabayashi K., Mukai R., Yamada A., Takasaki T., Kurane I., Yamaoka M., Terasawa A. and Konishi E.	Immunogenicity of a Japanese encephalitis DNA vaccine candidate in cynomolgus monkeys.	Vaccine	in press		2003

日本脳炎DNAワクチン： ウイルス体内移行を抑制する中和抗体の役割

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）

研究要旨 これまでに、日本脳炎ウイルス（JEV）の各タンパク領域をコードする遺伝子を組み込んだ細胞傷害性Tリンパ球（CTL）誘導型DNAワクチンを作製し、CTL誘導能及び防御効力をマウスモデルを用いて調べてきた。その結果、CTL誘導能を有するDNAワクチンでも防御能は低いことが示されてきた。今回、日本脳炎に対する防御機構の解明と共に、有効なワクチン戦略の開発を目的として、中和抗体誘導型DNAワクチンとCTL誘導型DNAワクチンの防御効力を直接比較した。中和抗体誘導型DNAワクチンとしてprM及びE遺伝子を組み込んだpcJEME、またCTL誘導型DNAワクチンとしてEの前半部、NS3及びNS5をコードする遺伝子をそれぞれ組み込んだpUJEE1、pUJENS3及びpUJENS5を用いた。100ugのDNAを1ドーズとしてBALB/cマウスに筋肉内投与した結果、pcJEMEの2ドーズはJEV北京3株の腹腔内投与による攻撃から完全防御したのに対して、他のDNAでは3ドーズでも部分防御しか示さなかった。この結果は、中和抗体誘導型DNAワクチンがCTL誘導型DNAワクチンより、防御効力の高いことを示す。また、腹腔内攻撃後の血液中また脳内ウイルス量を調べた結果、CTL誘導型DNAワクチンにより免疫したマウスでは攻撃直後から血液内にウイルスが検出され4日目には脳内ウイルス量が上昇するのに対して、中和抗体誘導型DNAワクチンにより免疫したマウスではいずれの材料にも攻撃後5日目までウイルスは検出されなかった。以上の結果は、抹消から中枢神経系へのウイルス体内移行を中和抗体が抑制することにより、マウスを脳炎から防御することを示す。

A. 研究目的

ウイルス病からの予防、回復には液性免疫と細胞性免疫の2大因子が働く。日本脳炎においても重要な防御因子として中和抗体及び細胞傷害性Tリンパ球（CTL）が考えられてきた。マウスを用いた移入実験により中和抗体と共にCTLの防御能力が報告されている。しかし、どちらの因子がより重要であるかは、双方の立場からの議論はあるものの直接証明がなく、不明であった。主要な防御因子の解明は、効力の高いワクチ

ンを開発するために重要である。特に、最近注目されている西ナイルウイルスは日本脳炎ウイルス（JEV）と遺伝子相同性が高く、西ナイル熱や西ナイル脳炎の予防策を講じる上においても、日本脳炎に対する防御機構の解明は重要である。

日本脳炎ウイルス（JEV）はフラビウイルス属に属する。フラビウイルスのゲノムには、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、中和抗体誘導に関わる蛋白はprM及びEであり、CTLエピトープを含むと報告されている主な蛋白はNS3及びEである。我々はこれまでに各タンパク領域をBALB/cマウスを用いて調べ、prM、NS4A及びNS4B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』:平成12年度同補助金「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(2)』)。しかし、いずれの領域も検知できるレベルの防御能は示さなかった。

本研究では、これらのCTL誘導型DNAワクチンを、prM及びE遺伝子を組み込んだ中和抗体誘導型DNAワクチンと防御効力について直接比較するとともに、日本脳炎に対する防御における中和抗体の役割を明らかにした。

B. 研究方法

JEV遺伝子組み込みプラスミドの作製:ベクタープラスミドとして、JEV蛋白がユビキチンとの融合蛋白として発現するように設計したpUBIQを用いた(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)。JEV中山株のE前半部、NS3及びNS5の遺伝子を組み込んで、それぞれpUJEE1、pUJENS3及びpUJENS5を得た(詳細は平成11年度及び12年度の上記研究班分担研究報告書に記載)。これらのプラスミドDNAは、Qiagen Plasmid Purification Kit (Qiagen社製)を用いて精製した。

マウス実験:雄BALB/cマウスに、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免疫した。中和抗体誘導型DNAワクチン (pcJEME) については6週齢時の1回または6と8週齢時の2回、またCTL

誘導型DNAワクチン(pUJEE1、pUJENS3、pUJENS5)については6、8及び10週齢時の3回で免疫した。12週齢時に100LD₅₀のJEV北京3株を腹腔内接種し、21日間観察した。

ウイルス力価測定:抗凝固剤として3.8%クエン酸ナトリウムを用い血漿を採取した。また、脳を採取し、7.5%BSAを含むPBSで10%乳剤にした。血漿及び脳乳剤に含まれるウイルス力価を、Vero細胞を用いたブランク法により測定した。

RT-PCR:50 ulの血漿から、200 ulのTryzol (Gibco)を用いてRNAを抽出した。次いで、Superscript First Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen)を用いて、逆転写酵素(RT)反応により、cDNAを作製した。プライマーにはNS5上の塩基配列であるAACCTTGGGCATGTAAGGGCA (8154-8134: nt#を示す。以下も同)を用いた。PCR反応には、上記のプライマーとACTGAAGCAGGCAGGGCT (7693-7710)を用いた。PCR産物を、1.5%アガロースゲルを用いて電気泳動し、エチジウムブロマイドで染色した。さらに、nested PCRを行い、JEV由来のPCR産物であることを確認した。

中和試験:90%ブラン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

中和抗体誘導型DNAワクチンとCTL誘導型DNAワクチンにおける防御効力の比較:中和抗体誘導型DNAワクチンであるpcJEME、またCTL誘導型DNAワクチンであるpUJEE1、pUJENS3あるいはpUJENS5で免疫したマウスにおける、致死量のウイルスによる攻撃からの防御効力を比較した。各グループ6匹の6週令の雄BALB/cマウスに、100 ugのpcJEMEを2週間隔で1-2回、また100 ugのpUJEE1、pUJENS3、pUJENS5、あるいはpUBIQを3週間隔で3回、筋肉内接種した。初回免疫から6週間後、100 LD₅₀のJEV北京3株で攻撃し、21日間生存状況を観察した(図1)。その結果、100 ugのpcJEMEを1回接種したグループでは部分防御(33%生

存)であったが、2回接種により完全防御(100%生存)を示した。一方、CTL誘導型DNAワクチンを3回接種したグループではいずれも部分防御であり、生存率は33%(pUJEE1接種グループ)、50%(pUJENS3接種グループ)、また67%(pUJENS5接種グループ)であった。また、pUBIQ接種グループでは全てのマウスが死亡した。以上の結果は、中和抗体誘導型DNAワクチンは、CTL誘導型DNAワクチンより効力が高いことを示す。

中和抗体誘導型DNAワクチンとCTL誘導型DNAワクチンにより免疫したマウスにおける体内ウイルス量の比較: 中和抗体誘導型DNAワクチンによる防御機構を明らかにする目的で、攻撃後の血漿中及び脳内ウイルス量を経日的に測定し、ウイルスの体内移行をCTL誘導型DNAワクチン免疫マウスと比較した(図2)。各グループ18匹の6週令の雄BALB/cマウスに100ugのpcJEMEを2週間隔で2回、また100ugのpUJEE1、pUJENS3あるいはpUBIQを2週間隔で3回筋肉内接種した。初回免疫から6週目に、全てのマウスを100LD₅₀のJEV北京3株で腹腔内攻撃した。攻撃後1時間目から5日目まで各グループ3匹のマウスから血清、血漿及び脳を採取し、中和抗体価、血漿中及び脳内の感染性ウイルス量を調べると共に、血漿中のウイルスRNAの検出を試みた。

平均中和抗体価は、pcJEME接種グループにおいて攻撃後3日目までは約1:10であったが、4日目に1:240、5日目に1:640と抗体価は上昇した(図2)。中和抗体の強い2次免疫応答を示す。一方、pUJEE1、pUJENS3あるいはpUBIQ接種グループにおいては、攻撃後2日目まで中和抗体価は1:10未満であり、3から5日目に1:50未満の低い上昇を示す程度であった。

血漿中ウイルス量は、pcJEME免疫グループにおいて攻撃後5日目まで検出できなかった(図2)。一方、その他のグループにおいては攻撃後1時間目と1日目に高い感染力価が認められた。攻撃ウイルスが腹腔内から血液中に移動した結果と考えられる。この移動は、pcJEME免疫マウスにおいても、示された。すなわち、血漿中に感染性ウイルスの検出はできなかったものの、攻

撃後1時間目から1日目には、RT-PCR法によりウイルスRNAが検出された(図には示さず)。腹腔内から血液内へ移動したウイルスの感染性が認められないことは、中和抗体により排除または中和されたことを示す。攻撃後3日目まで中和抗体価が1:10未満のpcJEME免疫マウスは、攻撃時の中和抗体価も検出レベル未満であることを示すが、これらのマウスにおいては、上記のように攻撃後4日目以降強い2次免疫応答が認められることから、検出レベル未満であっても低レベルの中和抗体が存在し、血漿中の感染性ウイルスを排除することが可能であったと考えられる。また、ウイルスRNAは攻撃後2日目以降にもすべてのグループに検出された。この結果は、脾臓や肝臓などの攻撃ウイルスによって感染した組織から血液中に供給されるウイルスが、中和抗体によって中和または排除されたことを示す。

脳内ウイルスは、pcJEME免疫グループにおいては攻撃後5日目まで検出されなかったが、その他のグループにおいては4日目以降、高い感染力価が検出された(図2)。中和抗体誘導型DNAワクチンで免疫したマウスにおいては血液中に感染性ウイルスは検出されず、脳内のウイルス感染が起らなかったのに対して、CTL誘導型DNAワクチン免疫マウスではウイルスの体内移行により脳内のウイルス感染が成立したと考えられる。なお、攻撃後1時間から1日目に低レベルの脳内ウイルスを有する個体が見られるが、脳内の血液に含まれる感染性ウイルスが検出されたものであって、脳内でのウイルス増殖を示すものではないと考えられる。

D. 考察

本研究は、日本脳炎の防御にはCTLより中和抗体が重要であることを証明し、中和抗体によるウイルス体内移行の抑制が主要な防御機構であることを示した。節足動物媒介性の脳炎ウイルスによる発症には、ウイルスの体内移行が必須である。ヒトの日本脳炎の場合、蚊の刺咬により体内に侵入したウイルスは、刺咬部位の近くの組織または所属リンパ節で増殖(1次増殖)した後、子孫ウイルスが血流に乗って(ウイル

ス血症) 脳に移動し、中枢神経系における増殖(2次増殖)が始まると考えられている。マウスモデルにおいては本研究で示されたように、抹消から接種されたウイルスが比較的短時間に血液中に移動した点において、ヒトにおける1次増殖を反映していないが、ウイルス血症、その後の2次増殖をシミュレートしている。本研究では、血液中の中和抗体が、体内移行しているウイルスを排除し、脳を感染から防御することを証明した。一方、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完全防御をもたらさなかった。中和抗体によるウイルス体内移行の抑制がより有効な防御機構であることを示す。

CTL誘導型DNAワクチン免疫マウスにおいて、脳内ウイルスカ価は攻撃後4日目に顕著に上昇した。ウイルスを脳内に直接接種した場合に増殖は直ちに始まるので、この差はウイルスが脳・血管関門を通過するための期間と考えられる。ウイルスが脳・血管関門を通過する機構は、血管内皮細胞に感染した後、子孫ウイルスが外膜細胞に感染し、さらにそこで増殖したウイルスが神経細胞に感染する、と考えられている。組織免疫化学染色で、血管内皮細胞におけるウイルス抗原の存在が証明されている。従って、CTL誘導型DNAワクチン免疫マウスにおいて、CTLが防御に働く唯一の機会は、血管内皮細胞の破壊かもしれない。

pUJENS3やpUJENS5により免疫したマウスにおいて誘導されるCTLは、低い防御効力しか示さなかった。しかし、感染マウスにおいては、多くの種類のCTLが誘導され、相乗的に防御効力を増加させるかもしれない。また、ヒトにおいては、CTLは1次増殖に対しても働く機会があり、本実験で推定されたCTLの防御効力より高い効力を示すことが考えられる。この点、マウスモデルはCTLの役割を研究するには制限があり、ヒトにおける中和抗体とCTLの防御効果の違いをより正しく反映させるには、サルを用いた評価が必要と思われる。

E. 結論

日本脳炎に対する防御にはCTLより中和抗体が重要であることがマウスモデルを用

いたDNAワクチンの直接比較により明らかにされた。抹消から中枢神経系へのウイルス体内移行の抑制が中和抗体の主要な防御機構であると考えられる。

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

Eiji Konishi and Tomoyuki Suzuki: Ratios of subclinical to clinical Japanese encephalitis (JE) virus infections in vaccinated populations: evaluation of an inactivated JE vaccine by comparing the ratios with those in unvaccinated populations. *Vaccine* 21, 98-107 (2002)

Eiji Konishi, Aya Terazawa and Jun-ichi Imoto: Simultaneous immunization with DNA and protein vaccines against Japanese encephalitis or dengue synergistically increases their own abilities to induce neutralizing antibody in mice. *Vaccine in press.*

Kiyoshi Tanabayashi, Ryozauro Mukai, Akio Yamada, Tomohiko Takasaki, Ichiro Kurane, Masaoki Yamaoka, Aya Terazawa, and Eiji Konishi: Immunogenicity of a Japanese encephalitis DNA vaccine candidate in cynomolgus monkeys. *Vaccine in press.*

2. 学会発表

Eiji Konishi and Tomoyuki Suzuki: Evaluation of an inactivated Japanese encephalitis vaccine by comparing ratios of subclinical to clinical Japanese encephalitis virus infections in vaccinated and unvaccinated populations. The 36th Joint Working Conference of the Japan-US Cooperative Medical Science Program Viral Diseases Panel, Matsumoto (2002).

石川知弘、小西英二：哺乳類細胞と蚊細胞から放出される日本脳炎ウイルス粒子の比較および粒子形成過程の形態学的解析。第37回日本脳炎ウイルス生態学研究会(2002)。

矢川京子、小西英二：日本脳炎ウイルス

prM/E 発現 Vero 細胞において NS1 が誘導する融合促進。第 37 回日本脳炎ウイルス生態学研究会（2002）。

寺澤 文、藤井 敦子、小西 英二：デング 1 型ウイルス望月株の prM および E 遺伝子を組み込んだプラスミドのマウスにおける中和抗体誘導能。第 37 回日本脳炎ウイルス生態学研究会（2002）。

山岡政興、小西英二：日本脳炎及びデング DNA ワクチンの中和抗体誘導能を増強する針無し注射器接種法。第 50 回日本ウイルス学会学術集会・総会（2002）。

小西英二：日本脳炎 DNA ワクチンおよびサブユニットワクチンの同時投与による中和抗体誘導能の相乗的上昇。第 50 回日本ウイルス学会学術集会・総会（2002）。

小西英二：日本脳炎から西ナイル脳炎へ。第 39 回近畿地区ウイルス疾患協議会研究会（2003）。

H. 知的財産権の出願・登録状況

国内特許（申請予定）

名称「DNA ワクチンの中和抗体誘導能を増強するタンパク・DNA 同時投与法」

発明者：小西英二（2003）

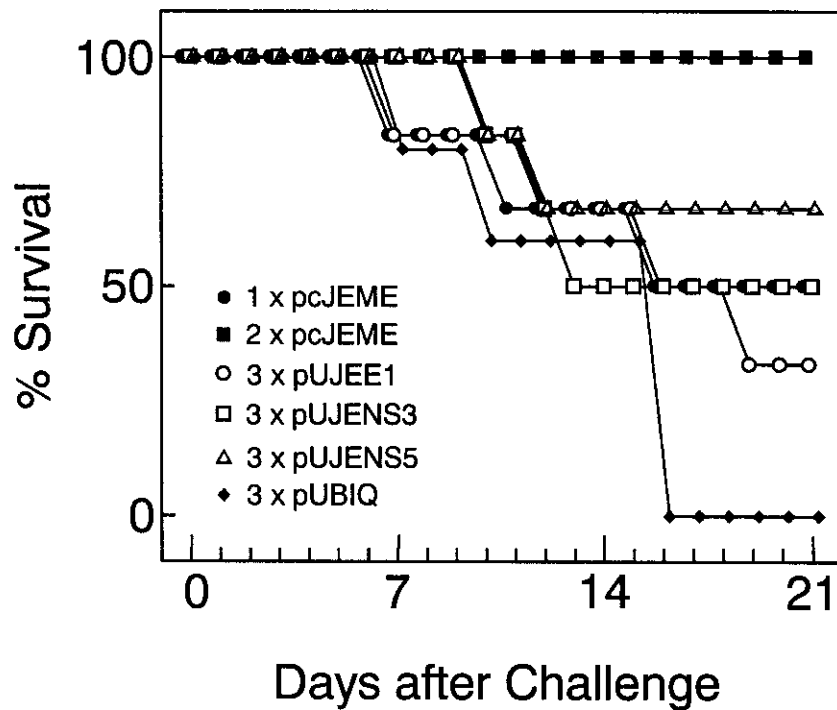


図 1. 中和抗体誘導型 DNA ワクチンと CTL 誘導型 DNA ワクチンにおける防御効力の比較。各グループ 6 匹の雄 BALB/c マウスに、100 ug の pcJEME を 1 回 (6 週令時) または 2 回 (6 及び 8 週令時)、また 100 ug の pUJEE1、pUJENS3、pUJENS5 あるいは pUBIQ を 3 回 (6、8 及び 10 週令時) 接種した。12 週令時に 100 LD₅₀ の JEV 北京 3 株で腹腔内攻撃を行い、21 日間生存状況を観察した。

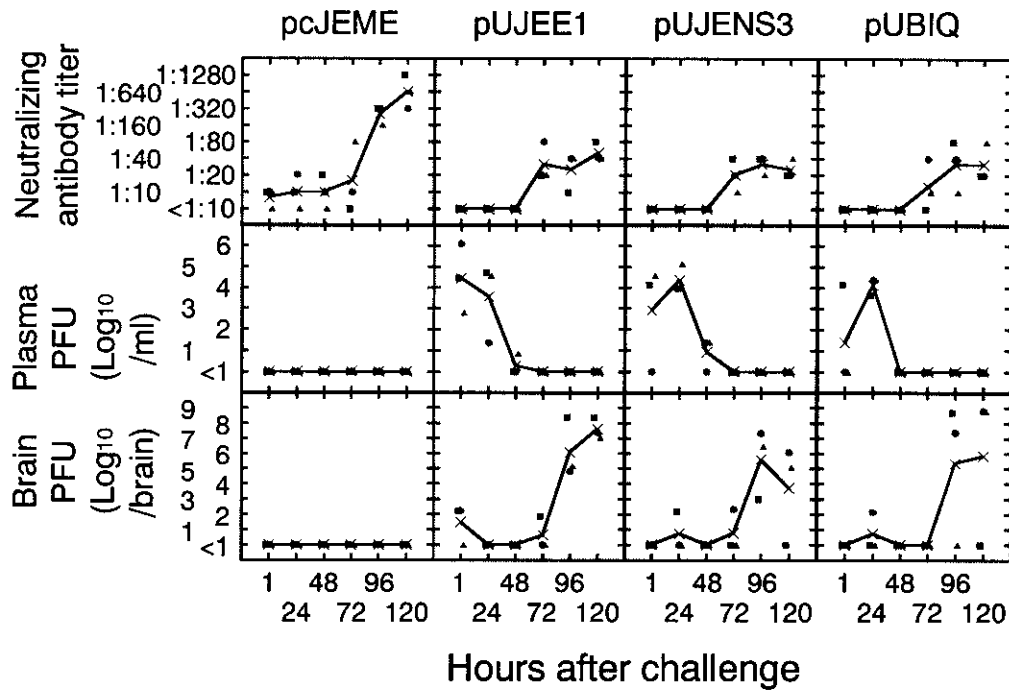


図2. 中和抗体誘導型DNA免疫マウスとCTL誘導型DNA免疫マウスにおける中和抗体価及び体内ウイルス量の比較。各グループ18匹の雄BALB/cマウスに、100 ugのpcJEMEを6及び8週令時に、100 ugのpUJEE1、pUJENS3あるいはpUBIQを6、8及び10週令時に筋肉内接種した。12週令時に全てのマウスを100 LD₅₀のJEV北京3株で腹腔内攻撃した。攻撃後5日目まで経日的に各グループ3匹のマウスから血清、血漿及び脳を採取した。血清を用いて中和抗体価を、血漿と脳を用いて感染性ウイルス量を測定した。それぞれのマウスを、●、▲、■で、3匹のマウスの平均値をXで示した。

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
Eiji Konishi and Tomoyuki Suzuki	Ratios of subclinical to clinical Japanese encephalitis (JE) virus infections in vaccinated populations: evaluation of an inactivated JE vaccine by comparing the ratios with those in unvaccinated populations	<i>Vaccine</i>	21	98-107	2002

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

粘膜免疫型日本脳炎ワクチンに関する研究

分担研究者 只野昌之 琉球大学医学部ウイルス学講座

協力研究者 新川武 琉球大学遺伝子実験センター

研究要旨

C 末端に 6 つの His 残基(His-Tag)を有するコレラトキシンB蛋白(CTB)と日本脳炎ウイルス(JEV)外殻蛋白ドメイン III(JE-E3)の融合蛋白(CTB/JE-E3/6H)を大腸菌の系で発現させた。ニッケルカラムで精製されたCTB/JE-E3/6HはG_{M1} ガングリオシドとの結合能を持つと共に、抗CT抗体と抗JE抗体のいずれとも反応した。ウエスタンブロッティングによる解析で、精製CTB/JE-E3/6Hは移動度の違いから7つの複合体を形成していた。それらの複合体のうち、5つは抗CT抗体と抗JE抗体の両方と反応したが、残りの2つはどちらか一方の抗体と反応した。また、それらの複合体を形成する単量体は主として2種類で、一方は抗JE抗体、他方は抗CT抗体と反応する異なった抗原性を有していた。精製CTB/JE-E3/6Hを経鼻あるいは腹腔内接種されたマウスの血清中に、抗JE抗体と抗CT抗体が検出された。さらに中和試験でも抗JE抗体が検出された。

A. 研究目的

日本脳炎ウイルス(JEV)や西ナイルウイルス(WNV)は蚊によって媒介され、ヒトに重篤な脳炎を引き起こす節足動物媒介性ウイルスである。一方、これらのウイルスの主な増幅動物は前者がブタ、後者が鳥類であることから両者は人獣共通ウイルスでもある。従って、両者による感染症の制御には増幅動物に対する徹底した対策が必要である。ところが、JEVは妊娠中以外はブタに対する病原性を示さないことから、大量に生産されている食肉豚へのワクチン接種はほとんど行われていない。また、野生鳥類へのWNVワクチン接種は不可能である。経口投与可能なワクチンは従来

のワクチンに比べ、飼料等に混ぜて投与することで接種できることから、家畜や野生動物へのワクチンとして期待される。また、接種法が簡便で安価なことから、デング出血熱などの発展途上国の疾患に対するヒト用ワクチンとしても有用と考えられる。本研究では、鼻腔や腸管粘膜からの免疫が可能な日本脳炎ワクチンを開発する目的で、粘膜親和性蛋白とJEV抗原の融合蛋白の発現を大腸菌の系で試み、マウスへの鼻腔および腹腔接種に対する免疫応答の比較から融合蛋白による粘膜免疫の有用性を検討した。

B. 研究方法

大腸菌発現ベクター(pET[CTB/JE-E3/6H])の構築: CTB と JE-E3 の融合遺伝子を含むプラスミド pBI[CTB/JE-E3] を鋳型に、PCR 法で下流に 6 つの His をコードするオリゴヌクレオチドを含む CTB/JE-E3 融合遺伝子 cDNA 断片を調整した。この cDNA を大腸菌発現ベクター pET43 のクローニングサイトに挿入して pET[CTB/JE-E3/6H] を構築した。

G_{M1}-ELISA: 発現蛋白の検出と濃度測定、抗原性を検出に用いた G_{M1}-ELISA は以下のような手順で行った。ELISA プレートに固相化した G_{M1} ガングリオシドに CTB ペンタマー、あるいは試料中の CTB/JE-E3/6H 複合体を捕捉し、一次抗体に抗 CT ウサギ抗体や抗 JE ウサギ抗体、二次抗体に AP 標識抗ウサギ IgG やキ抗体を用いる間接法で行った。

間接 ELISA: 濃縮日本脳炎ワクチン (阪大微生物病研究会より分与) を固相抗原とした間接 IgG-ELISA で JE-IgG 抗体を測定した。

中和試験: 96well プレートに培養した BHK-21 細胞を用いる 50% フォーカス減少法で行った。抗 JE ウサギ抗体を一次抗体とする間接免疫染色法で JEV 感染細胞のフォーカスを染色した。

マウス免疫実験: 4 週齢の Balb/c マウス (メス) を用い、経鼻や腹腔内接種を行った。

ウェスタンブロッティング: 定法により菌体抽出液からニッケルカラムで精製された試料は通常の蛋白溶解液を加え、100°C、1 分間処理、あるいは非加熱処理した後に、定法により SDS-PAGE を行い、ニトロセルロース膜に転写した後に、抗 CT 抗体、あるいは抗 JE

抗体を一次抗体とする間接酵素抗体法で特異抗原の検出を行った。

倫理面への配慮: 動物実験は琉球大学動物実験委員会から承認を得て行われた。DNA 組換え実験は琉球大学 DNA 組換え実験委員会の承認を得て行われた。

C. 研究結果

CTB/JE-E3/6H を発現する大腸菌の抽出液からニッケルカラム法で精製されたサンプルは精製前に比べて、抗 CT 抗体を一次抗体としたときの G_{M1}-ELISA 活性が数百上昇した (表 1)。ウェスタンブロッティングによる解析で、加熱処理しない精製 CTB/JE-E3/6H は抗 CT 抗体、および抗 JE 抗体の両方、あるいはどちらか一方に反応するものを含めて、少なくとも 7 つの複合体を含むことを示す結果が得られた (図 2 a)。両抗体を用いた免疫染色で、どちらか一方に反応するバンドがそれぞれ一本ずつ、計二本のバンドが認められた (図 2 a 矢印)。100°C で処理した試料の解析では、両抗体が示す主たるバンドの移動度は一致しなかった (図 2 b 矢印)。精製 CTB/JE-E3/6H を用いたマウス免疫実験で、単独で腹腔内接種した方が最も高い免疫応答を示したが、単独で鼻腔内接種免疫したマウスでも粘膜アジュバントと共に鼻腔内接種した場合と同等の ELISA-JE 抗体が産生された (図 3)。さらに、結果には示さないが、ELISA 抗体と同様に中和抗体の産生も誘導されていることが確認された。

考察

粘膜親和性蛋白と JE 抗原の融合蛋白発現に関するこれまでの研究で、植物発現ベクターを用いた系では、粗抽出液による経粘膜免疫で融合蛋白に対する特異的な抗体産生を誘導できたが、発現蛋白を精製することが困難なため、さらに強い免疫を誘導することができなかった。今回は、C末端に His-Tag を付加した融合蛋白を発現させることで、簡便に精製することができた。また、精製融合蛋白によるマウスの免疫実験では、抗 JE 抗体と抗 CT 抗体の両方が誘導された。加えて、免疫マウス血清中には、ELISA-JE 抗体のみならず中和 JE 抗体も検出された。この大腸菌の系で発現した融合蛋白を免疫したマウスにおける感染防御免疫の有無に関しては実験を計画しているところである。

発現融合蛋白の生化学的性状の検討で、発現蛋白は幾つかの複合体を形成していることがわかった。また、その内少なくとも二つは JE、CT いずれか一方の抗原性を示していた。加熱処理した発現蛋白は泳動度の異なる二種類の蛋白として検出され、一方は JE、他方は CTB の抗原性を示したが、演繹される分子量はそれぞれ単独分子のそれよりは大きかった。これらのことは、ほぼ構築した発現ベクターの設計通りに目的の蛋白が発現したが、おおむね完全な CTB/JE-E3-H6 と分子量の小さな不完全融合蛋白の二種類が発現していることが推測された。前者は CTB としての抗原性を示すが、立体障害により JE-E3 としての抗原

性を示さないと考えられる。また、後者は JE-E3 としての抗原性を示すが、CTB の抗原性を示さない分子として発現していると思われる。これら二種類の融合蛋白が複数の組み合わせで複合体を形成していると推測された。これらのことを明確にするためには、さらに詳細な検討が必要である。また、これまでの研究で用いた植物、および大腸菌の発現系では、CTB と融合させる目的蛋白の分子量には限界があると思われた。これまでの研究で、 G_{M1} ガングリオシドに結合可能な CTB/JE-E 融合蛋白の目的蛋白は E 蛋白のドメイン III を含む 162 アミノ酸残基が最大で、重要な中和エピトープを含むと考えられている E 蛋白のドメイン I および II、あるいは I から III 全てのドメインを含むようなコンストラクトでは発現が成功していない。より免疫原性の強い粘膜免疫 JE ワクチンの開発には、E 蛋白分子のほとんどの部分を含むような目的蛋白を CTB との融合蛋白として発現させるだけではなく、E 蛋白としての本来の免疫原性を損なうことなく G_{M1} ガングリオシドに結合可能な複合体を形成させる必要がある。最近、別のアプローチで、JE-E 蛋白のドメイン I および II を含む部分と CTB の融合蛋白を G_{M1} ガングリオシドに結合可能な複合体として発現させることに成功した(data not shown)。今後は、その免疫原性や生化学的性状、抗原性状を詳細にすると共に、同じ手法で E 蛋白のほとんどの部分と CTB の融合蛋白の発現を試みる予定である。さらに、融合蛋白を腸管粘膜まで変性させることなくデリバリーするシステム

についても検討する。

E. 結論

大腸菌の系で発現させた CTB/JE-E3 融合蛋白は、ニッケルカラム法で簡単に精製可能で、効率的に複合体を形成し、免疫原性においても ELISA で検出可能な JE 特異抗体が誘導されるなど、植物の系で発現させた場合に比べて優れていた。

G. 本研究に関連する研究発表

1)論文

Arakawa T. (2002) Plant-based vaccines. *Igaku no ayumi* 200:1174-1175. (article in Japanese)

2)学会発表

1. Takeshi Arakawa: Molecular farming for the production of proteins with pharmaceutical values, The Seventh Nagasaki-Singapore Symposium on Medical Sciences “Infectious Diseases and Host Immune Responses”
2. Takeshi Arakawa: Plant molecular farming for the production of recombinant vaccines, 7th Asian-Pacific Congress for Parasitic Zoonoses
3. Takeshi Arakawa: Molecular farming for the production of therapeutic proteins, 5th International conference of Asia-Pacific International Molecular Biology Network
4. 新川武: 植物ワクチン、平成14年日本生体防御学会総会

H. 知的財産権の出願・登録状況

1) 特許

1. Australian Patent 750623 Methods and substances for preventing and treating autoimmune disease.

2. 日本脳炎ワクチンによる西ナイルウイルスの感染に対する交叉防御、発明者：只野昌之ほか、国内特許出願中、特願2002-117980

3. 不活化日本脳炎ウイルスおよびウイルス由来の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 (systemic immune response) の誘導ならびに感染防御効果、発明者：新川武ほか、国内特許出願中、特願2001-316859

2) 実用新案

なし

3) その他

なし

表1. CTB/JE-E3融合蛋白の精製

	蛋白濃度(g/ml)	G _{M1} -ELISA OD値 (Anti-CT)
精製前 (ライセート)	200	>2.0
精製後 (ニッケルカラム)	0.1-0.2	≒1.6

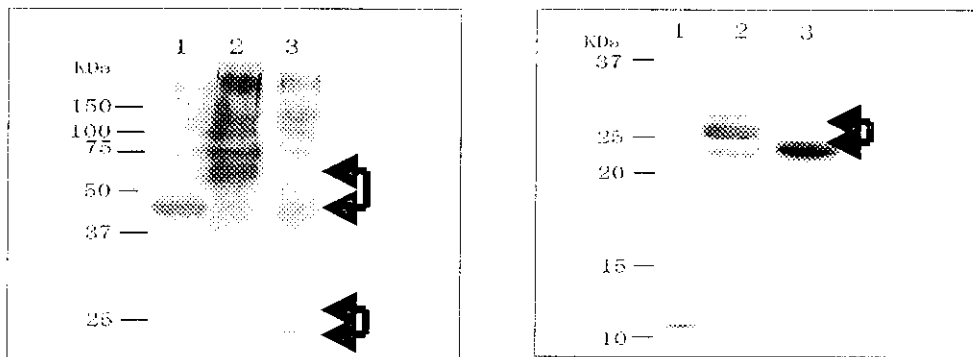


図2. ウェスタンブロッティングによる精製大腸菌発現蛋白の解析

1. CTB, 2. CTBJE-Canti-CT、3. CTBJE-C.....anti-JE

a : 50°C、10min、b : 100°C、1min

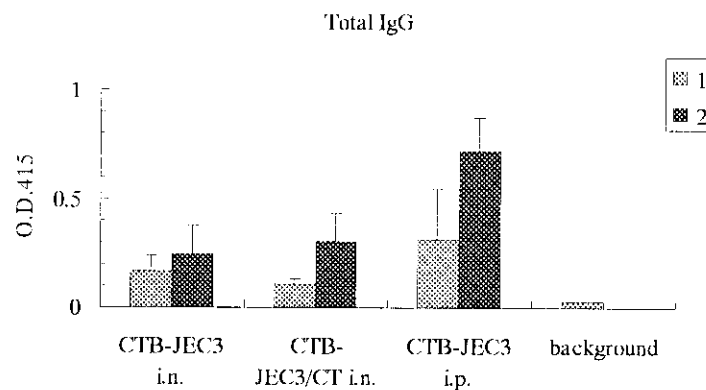


図3. 大腸菌発現CTB/JE-E3融合蛋白を摂取したマウスの抗JE抗体産生