

ノムの検出を行った。RT-PCR の反応条件として、RT 反応：53℃ 30 分、PCR 反応：(1 回) 94℃ 1 分、(35 回) 94℃ 30b、53℃30 秒、68℃1 分、(1 回) 68℃2 分 を設定して、MJ Research 社の PCR 増幅装置を使用した。デングウイルスに特異的なプライマーとして、4 つの血清型に共通な配列を有する DC primer (DC1 (5'-3')：TCAATATGCTGAAACGCGAGAAACCG、および DC2 (5'-3')：TTGCACCAACAGTCAATGTCTTCAGGTT) を使用して、511 bp の特異的 PCR 産物を得た (Lanciotti, R. S., Calisher, C. H., Gubler, D. J., Chang, G. J., and Vorndam, A. V.: Rapid detection and typing of dengue viruses from clinical samples by using reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.*, 30(3):545-551, 1992)。

(倫理面への配慮) ウエストナイルウイルスは、国立感染症研究所から大分医科大学 (現 大分大学医学部) に分与されたものである。また、大分医科大学 (現 大分大学) 医学部附属動物実験施設内での蚊の飼育および媒介実験に関連して、大分医科大学 (現 大分大学) 医学部動物実験委員会からの承認を得た。デングウイルスはタイ国出血熱患者から分離された。

C. 研究結果

C. 1 実験 1. ウエストナイルウイルスに対するアカイエカの媒介能

胸部注射したアカイエカに吸血されたマウスの発症とマウス血中からの WNV ゲノムの検出：複数の感染蚊の入った飼育容器の上部蓋のネットの上にマウス 2 個体を 1 時間載せて、蚊の吸血の

有無を観察した。飼育容器 No. 030604. 1 では、それぞれのマウスに 4 個体のアカイエカが吸血をプロービングが観察された。飼育容器 No. 030604. 2 では、1 個体のマウスに 3 個体あるいは 1 個体の感染蚊が吸血あるいはプロービングを行っていることが観察された。また、飼育容器 No. 030604. 3 では、プロービングを 1 個体の蚊がマウスに行っていた (Table 1)。

吸血 10 日後までマウスを観察したところ、3、7、10 日後に麻痺用の症状が出た (Table 2)。それらマウスの尾静脈から採血して、ウイルスゲノムの有無を RT-PCR で検討したところ、マウス 3 個体中の 1 個体 (Fig 1A のレーン 9) で極めて薄いバンドが検出された。明瞭なバンドの有無を確かめるために、1 回目の増幅産物を再度 PCR を行ったところ、サイズの異なる PCR 産物が他のサンプルでも得られた (Fig 1B)。そこで、全ての産物の塩基配列を調べたところ、Fig 1A と Fig 1B のレーン 9 のみが WNV ゲノムの配列と 100%一致した (Fig. 2)。

マウスに感染を起こしたアカイエカ雌成虫からの本ウイルスゲノムの検出：Fig. 2 でウイルスゲノムが検出されたマウスを吸血した蚊は 1 個体であった。その蚊を頭、胸部、腹部に分離して、それぞれの部位におけるウイルスゲノムの有無を RT-PCR 法で調べた。その結果、いずれの部位からも WNV ゲノムが検出された。蚊からのデータでも、胸部ノウイルスが感染していたことから唾液腺の感染が裏付けられた。

C. 2 実験 2. デングウイルスに対するミヤラシマカの感受性試験

胸部接種法によるミヤラシマカ雌成虫体内で

のウイルス増殖：28℃温度で 14 日間飼育したミヤラシマカからのウイルスゲノムの有無を調べるためにデングウイルス特異的プライマーを使用して RT-PCR を行った結果、いずれの個体からも明瞭な特異的 PCR 産物が認められた (Table 3)。

経口感染雌成虫の 28℃でのウイルス増殖：28℃で 14 日間飼育した経口感染ミヤラシマカからのウイルスゲノムの有無を調べるために、RT-PCR を行ったところ、大凡 30%の供試蚊の体内から本ゲノムが認められた (Fig. 3)。蚊の腹部からウイルスゲノムが検出された蚊個体については、胸部、頭部、脚部におけるウイルスゲノムの有無を調べたところ、6 個体中の 3 個体はいずれの部位でも本ゲノム陽性であったが、残り 3 個体では頭部や脚部陰性のもも観察された (Table 4)。ネッタイシマカやヒトスジシマカでも同様なことが観察されたことから、ミヤラシマカはヒトスジシマカやネッタイシマカと同様なウイルス感受性を持つと推察される。また、ミヤラシマカの中腸にも、ウイルスが他の部位に放出されない所謂 midgut barrier が存在すると思われた。

D. 考察

ウエストナイルウイルスに感受性を持つ日本産のアカイエカ、チカイエカおよびヒトスジシマカのうち、アカイエカ雌成虫がウエストナイルウイルスをマウスに媒介することが明らかとなった。同じ *Culex pipiens* グループに属するチカイエカも感受性を持つことから、ウイルス媒介能を持つと推察される。ウエストナイルウイルスの侵入が我国でも懸念されていることから、アカイエカ、チカイエカ、ヒトスジシマカ、などの蚊種の

サーベイランスを今後強化する必要がある。また、今回の媒介試験では、症状を示しながらも血中のウイルスゲノムを証明できなかったマウス個体が観察された。このことからマウスの本ウイルス感受性はさほど高くはないように思われた。

琉球列島の石垣島に生息するミヤラシマカがデングウイルスに対して感受性を持つことが初めて明らかとなった。ミヤラシマカの感染率は、対照蚊種のヒトスジシマカやネッタイシマカのそれらと同程度であった。ちなみに、蚊一個体部位でのウイルスゲノムの検出程度を調べたところ、ゲノムの検出された 50%の蚊個体は、いずれの部位からもゲノムが検出された。しかし、その他の個体では、腹部のみ、腹部と胸部のみ、あるいは腹部と頭部のみがウイルスゲノム陽性を示していた。腹部のみ陽性個体は、おそらく中腸組織からのウイルス放出が認められない個体と考えられる。しかしながら、後者の腹部と胸部のみ、あるいは腹部と頭部のみ陽性であった蚊個体については、明確な理由が不明である。同様なことは、ウエストナイルウイルスの経口感染アカイエカにおいても、腹部、胸部および脚部がウイルスゲノム陽性であったが頭部は陰性であった事例で観察されている。ゲノムを増幅させる RT-PCR 法の検出感度に由来するのか、あるいは PCR 阻害要因が頭部組織に多く含まれているのかもしれない。今後検討する必要がある。また、ヒトスジシマカ、ミヤラシマカなどと同じグループに属する蚊種が日本に生息しているので、それらの本ウイルス感受性を今後検討する必要がある。

E. 結論

(1) 胸部接種法でウエストナイルウイルス感染

のアカイエカがマウス吸血でウイルスが媒介されることが初めて証明された。

(2) 日本産ミヤラシマカがヒトスジシマカと同程度のウイルス感受性を有することが初めて明らかとなった。

2. 行政施策への貢献の可能性

(1) 日本産アカイエカのウエストナイルウイルス媒介能、日本産ミヤラシマカのデングウイルス感受性が明らかとなったことから、モニタリング、あるいは実際の媒介蚊対策計画を講じる際に役立つ成果である。ベクターの疫学調査への利用が可能となった。

(2) 日本産アカイエカのウエストナイルウイルス伝播能を明らかにしたことにより、標的蚊種の蚊駆除が可能となった。

(3) デングウイルスを媒介可能と予測される蚊種が我が国に複数生息していることから、道の蚊種の本ウイルス感受性を今後調査する必要がある。

F. 健康危険情報

ウエストナイルウイルスやデングウイルス保有蚊が外国から我国へ侵入するのを未然に防ぐために、PCR 装置を使った全国的な媒介蚊サーベイランスを行う必要がある。

G. 研究発表

1. 論文発表

(1) Mizutani, T., Kobayashi, M., Eshita, Y., Inanami, O., Yamamori, T., Goto, A., Ako, Y., Miyoshi, H., Miyamoto, H., Kariwa, H., Kuwabara M. and Takashima I. (2003):

Characterization of JNK-like protein derived from a mosquito cell line, C6/36. *Insect Mol. Biol.*, 12(1):61-66.

(2) Eshita, Y., Takasaki, T., Yamada, K. and Kurane, I. (2003) : Isolation of arboviruses from field-collected mosquitoes (Chapter 6). *In: Anthology VI. Arthropod Borne Diseases*, (Edited by Richmond, J. Y.), American Biological Safety Association. Illinois, pp.63-71.

(3) Mizutani, T., Kobayashi, M., Eshita, Y., Shirato, K., Kimura, T., Ako, Y., Miyoshi, H., Takasaki, T., Kurane, I., Kariwa, H., Umemura T. and Takashima I. (2003) : Involvement of the JNK-like protein of the *Aedes albopictus* mosquito cell line, C6/36, in phagocytosis, endocytosis and infection of West Nile virus. *Insect Mol. Biol.*, 12 (5) : 491-499.

(4) 林 昭宏、鎌倉和政、多賀賢一郎、森 英人、井村俊郎、江下優樹、内田幸憲 (2003) : One step RT-PCR 法による媒介蚊からのフラビウイルス RNA の検出条件の検討。 *感染症学雑誌*。 77(10) : 822-829.

2. 学会発表

水谷哲也、小林正之、江下優樹、白戸憲也、赤穂芳彦、三好洋嗣、荻和宏明、高島郁夫 (2003) : ヒトスジシマカ由来の C6/36 細胞におけるウエストナイルウイルスの感染防御 - ウイルス感染

における JNK シグナル伝達の役割。 第 55 回日本衛生動物学会大会。2003 年 3 月 31 日-4 月 2 日、大分医科大学医学部、 Med. Entomol. Zool., 54 (大会特集号) : 24, 2003.

佐々木年則、沢辺京子、江下優樹、伊藤美佳子、高崎智彦、倉根一郎、小林睦生 (2003) : VecTest による蚊からのウエストナイルウイルスの検出。第 55 回日本衛生動物学会大会。2003 年 3 月 31 日-4 月 2 日、大分医科大学医学部、Med. Entomol. Zool., 54 (大会特集号) : 41, 2003.

江下優樹、安西三郎、高崎智彦、山田堅一郎、内田幸憲、高島郁夫、倉根一郎 (2003) : 蚊類のアルボウイルス媒介能 (5) 異なる温度で飼育したアカイエカ、チカイエカ、ヒトスジシマカのウエストナイルウイルス感受性。第 55 回日本衛生動物学会大会。2003 年 3 月 31 日-4 月 2 日、大分医科大学医学部、 Med. Entomol. Zool., 54 (大会特集号) : 42 , 2003.

江下優樹、安西三郎、牧野芳大、福田昌子、高岡宏行、Disla, M.、Solis M. A. T.、Cesn, A. J.、Castro, M.、板倉英世、竹下正純 (2003) : 蚊類のアルボウイルス媒介能 (6) ドミニカ共和国におけるデングウイルス媒介蚊。第 55 回日本衛生動物学会大会。2003 年 3 月 31 日-4 月 2 日、大分医科大学医学部、 Med. Entomol. Zool., 54 (大会特集号) : 42, 2003.

江下優樹、安西三郎、高崎智彦、山田堅一郎、内田幸憲、高島郁夫、倉根一郎 (2003) : 日本の蚊のウエストナイルウイルス媒介能 (シンポジウ

ム) . 2003 年 5 月 15・16 日、第 38 回日本脳炎ウイルス生態学研究会、マリンヒルホテル小樽。第 38 回日本脳炎ウイルス生態学研究会講演抄録・プログラム : 。

Mizutani, T, Kobayashi, M, Eshita, Y, Shirato, K, Kimura, T, Ako, Y, Miyoshi, H, Takasaki, T, Kurane, I, Kariwa, H, Umemura, T, and Takashima, I. (2003) : Involvement of the JNK-like protein of the *Aedes albopictus* mosquito cell line, C6/36, in infection of West Nile virus. The 37th Joint Diseases Panels Meeting, Joint Conference on Viral Diseases, Japan-United Stated Cooperative Medical Science program. Houston, USA, July 18-20, 2003.

赤穂芳彦、水谷哲也、三好洋嗣、小林正之、白戸憲也、江下優樹、木村享史、稲波修、菊和宏明、高島郁夫 (2003) : 西ナイルウイルスの感染における JNK の役割。136 回 日本獣医学会大会。2003 年 10 月 3 日-5 日 青森市、北里大学。

江下優樹 (2003) : 日本における疾病媒介蚊対策を考える。一米国におけるウエストナイル熱蔓延から学ぶこと一講演 2 : 日本に生息する蚊とそのウエストナイルウイルス媒介能について。第 47 回全国環境衛生大会 第一分科会「生活衛生」。2003 年 10 月 15-16 日、岐阜市、長良川国際会議場・大会議場、第 47 回全国環境衛生大会 抄録集、 74-75, 2003。

江下優樹、安西三郎、Srisawat Raweevan、多森

直樹、高崎智彦、内田幸憲、高島郁夫、倉根一郎 (2003) : 蚊類のアルボウイルス媒介能 (7) 日本産アカイエカのウエストナイルウイルス媒介試験. 第 56 回日本寄生虫学会南日本支部大会・第 53 回日本衛生動物学会南日本支部大会・㊦大会。2003 年 10 月 25-26 日、鹿児島市、鹿児島大学稲盛会館 (郡元キャンパス)、 Med. Entomol. Zool., 54 : 2003.

水谷哲也、小林正之、江下優樹、白戸憲也、赤穂芳彦、三好洋嗣、木村淳史、高崎智彦、梅村孝司、荻和宏明、倉根一郎、高島郁夫 (2003) : 蚊の細胞へのウエストナイルウイルスの侵入における活性化 JNK の重要性。第 51 回日本ウイルス学会学術集会・総会。2003 年 10 月 27, 28, 29 日、京都市、国立京都国際会館、(プログラム・抄録集) :156, 2003.

江下優樹 (2003) : ウエストナイルウイルスとその媒介蚊。第 21 回九州実験動物研究会総会・第 23 回日本実験動物技術者協会九州支部会研究発表会 共同開催、2003 年 11 月 9 日、大分市、大分大学医学部看護学科講義棟、特別講演 (13:00-14:00)。九州実験動物雑誌、No. 19: 64, 2003.

Raweevan Srisawat, Narumon Komalamisra, Somjai Leemingsawat, Naoki Tamori, Saburo Anzai, Yupha Rongsriyam, and Yuki Eshita (2003) : Susceptibility of Japanese *Aedes (Stegomyia)* mosquito to dengue virus. Food- and Water-borne Parasitic Zoonoses and Joint International Tropical Medicine Meeting 2003.

Siam City Hotel, Bangkok, Thailand, December 2-4, 2003.

江下優樹 (2004) : 蚊媒介性疾患としてのアルボウイルス症。第 28 回日本熱帯医学会九州支部大会。2004 年 1 月 31 日 (土) -2 月 1 日 (日)。大分大学医学部看護学科棟、大分。

江下優樹、Srisawat Raweevan、安西三郎、多森直樹、Narumon Komalamisra、Somjai Leemingsawat、Yupha Rongsriyam、牛島廣治 (2004) : タイ国のデング熱流行地域で採集した媒介蚊からのデングウイルスゲノム検出。第 19 回日本国際保健医療学会東日本地方会。2004 年 2 月 28 日 (土曜日)。東京大学医学部図書館、東京。

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

特になし

Table 1 Mice probing and/or engorgement by WNV infected *Culex pipiens pallens* and *Trypteroides bambusa*

	Mosquito species					
	<i>Cx.p.pallens</i>		<i>Cx.p.pallens</i>		<i>Cx.p.pallens</i>	<i>Tr.bambusa</i>
Mosq.cup No.	030604.1		030604.2		030604.3	030604.7
Mouse No.	1	2	3	4	5	6
	4*/4**	4/4	1/1	3/3	1***/1	1***/1

*: Number of mosquitoes engorged fully

** : Number of mosquitoes tested

***: Number of mosquitoes probed without engorging

Table 2 Detection of West Nile virus genome in blood of mice bitten/engorged by intrathoracically infected *Culex pipiens pallens* female mosquitoes post 14 days

Days post infection	030604.1		030604.2		030604.3	030604.4	030604.8	030604.7
	1	2	3	4	5	6	7	8
1	no sample	no sample	no sample	no sample	no sample	no sample	no sample	no sample
3	,-	,-(sick?)	NT	NT	NT	NT	NT	NT
5	,-	,-(sick)	,-	NT	NT	NT	NT	NT
7	,-	?(dead)	±(sick,blood)*	NT	NT	NT	NT	NT
8	,-			NT	NT	NT	NT	NT
10	-(sick,blood)			NT	NT	NT	NT	NT
17				NT	NT	NT	NT	NT

±: Very faint WNV specific band was observed by RT-PCR,

, -: No band of RT-PCR product,

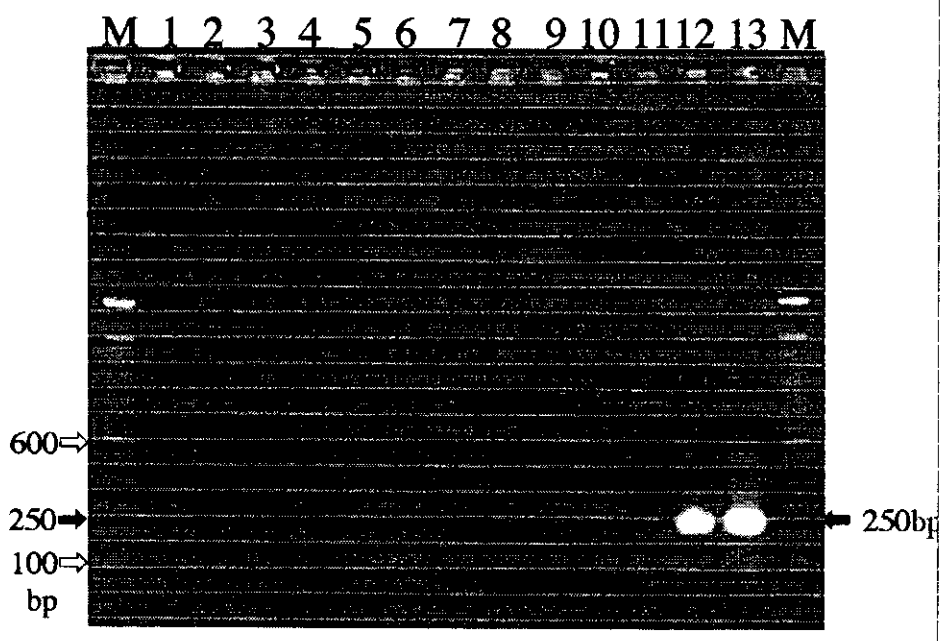


Fig. 1A

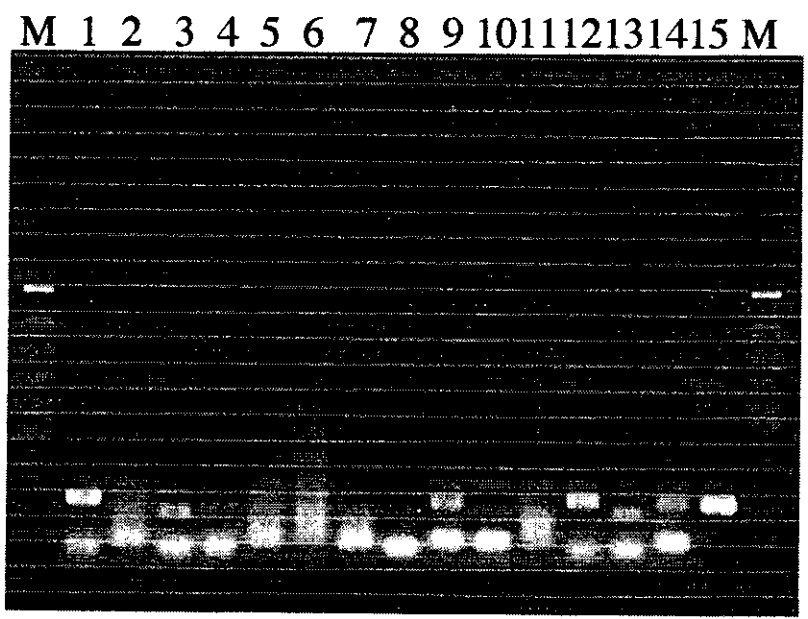


Fig. 1B

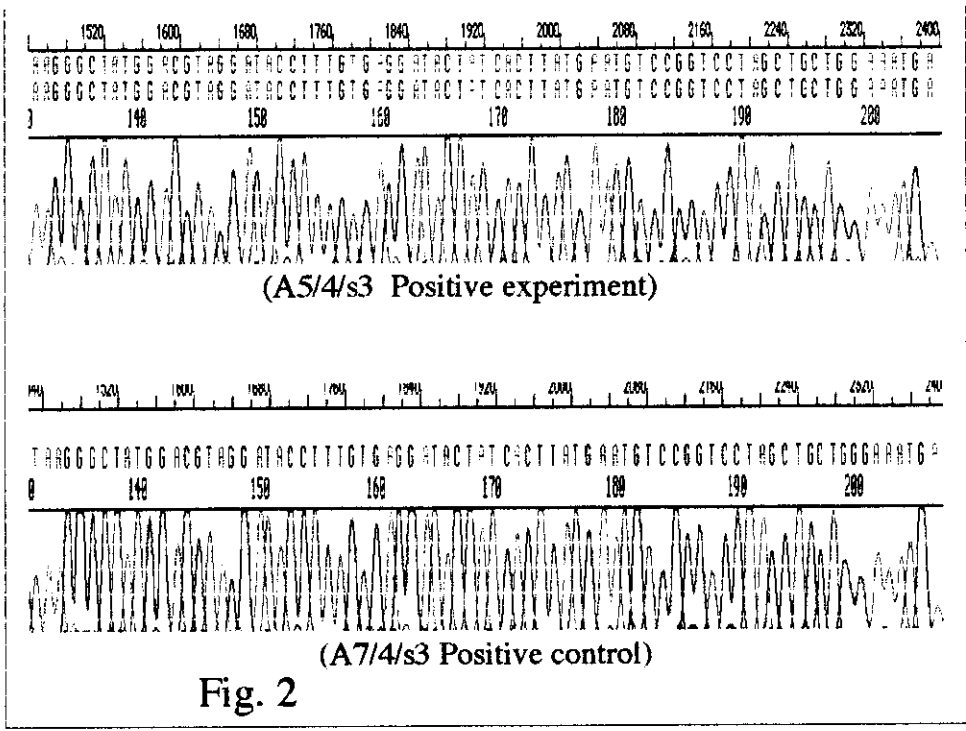


Fig. 2

TABLE 3

Infection rates of Aedes galloisi, Aedes flavopictus miyazui and Aedes aegypti to 18 days post intrathoracic inoculation with 6 x10⁶ FFU of dengue type 2 virus

Mosquito species	Total no. females examined	Mosquito tissue infection (%) ^a			
		Abdomen	Thorax	Head	Legs
<i>Aedes flavopictus miyazui</i>	9	9/9(100)	9/9(100)	9/9(100)	9/9(100)
<i>Aedes galloisi</i>	1	1/1(100)	1/1(100)	1/1(100)	1/1(100)
<i>Aedes aegypti</i>	5	5/5(100)	5/5(100)	5/5(100)	5/5(100)

^aInfection rate : Number of mosquito tissue positive^b X 100 / Number of mosquito tissue examined^c

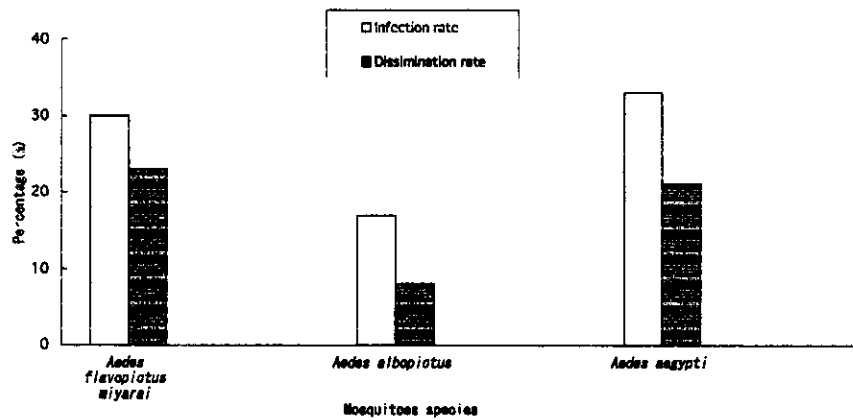


Figure 3. Infection and Dissemination rate of *Aedes flavopictus miyagai*, *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti* infected orally with dengue type 2 virus

備考: Infection rate: ウイルス侵入部位の蚊中腸の感染率
 Dissemination rate (Disseminated infection rate): 蚊中腸から他組織へウイルスが伝播した際の感染率

TABLE 4
 Infection intensity of each tissue part of individual mosquito infected orally with 6×10^6 dengue type 2 virus

Mosquito species	Degree of Virus-blood-sugar feeding ^a	Mosquito number	Infection degree of mosquito tissue			
			Abdomen	Thorax	Head	Legs
<i>Ae. flavopictus miyagai</i>	fully-medium	26	++ ^b	++	++	++
		27	++	-	-	-
		28	+	+	-	-
		29	++	++	++	++
		30	++	-	-	-
		35				
	medium-faint	40	++	++	++	++
		52	++	++	++	++
		53	++	++	-	-
<i>Ae. albopictus</i>	fully-medium	55		-	-	-
		58	++	++	+	+
<i>Ae. aegypti</i>	fully-medium	1	++	-	-	-
		2	++	-	++	++
		3	++	++	++	++
		6	!	!	-	-
		18				
		19	++	++	++	++
		20	+	-	-	-
		22	++	-	-	-

^a Fully to medium fed mosquitoes were equally in stage 5 to 3, and medium to faint fed them equally in stages 3 to 2^c described by Pillitt and Jones (1972).
^b Intensity level of dengue infection in each mosquito tissue was determined by intensity of PCR band produced by KI-PCR reaction as follows, strong band (++) , faint band (+) and negative PCR band (-).

厚生労働科学研究費補助金（新興再興感染症研究事業）
分担研究報告書

DNAワクチンの抗原産生能と中和抗体誘導能との関係：
デング4価ワクチンへの展望

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 寺澤 文（神戸大学医学部医療基礎学講座）
藤井 敦子（神戸大学医学部医療基礎学講座）

研究要旨 DNAワクチンを接種した宿主内で免疫応答が開始される機構はいまだ不明の点が多い。特に、接種部位である筋肉内でのウイルス抗原の産生量に関する報告はない。抗原産生量に関する知見は、DNAワクチンの利点である混合免疫、特にデング4価ワクチンにおけるドーズ調整に関して有用な情報となる。本研究の目的は、DNAワクチンの*in vivo*及び*in vitro*での抗原産性能とマウスにおける中和抗体誘導能との関係を明らかにすることである。4週令のICRマウスに、日本脳炎、デング1型またはデング2型に対するDNAワクチンを投与して調べた結果、(1) DNAワクチンの*in vivo*及び*in vitro*での抗原産性能は免疫後2-11週目の中和抗体価と関係した、(2) しかし免疫後14-18週目には3種DNAワクチンによる中和抗体誘導レベルには免疫初期ほど大きな差は認められなかった。*in vitro*における抗原産性能が1,000倍以上異なるDNAワクチンでも、中和抗体レベルの差が4倍以下であり、デング4価ワクチン作製におけるDNAワクチンの長所と考えられた。

A. 研究目的

デング熱/デング出血熱は、地球規模のフラビウイルス病である。しかし、デングに対する認可ワクチンは無い。デングワクチンの開発を困難にしている理由は、4つの血清型をもつデングのある型に感染した後、別の型に感染した場合、中和活性をもたない交差性の抗体が免疫エンハンスメントの機構により重症型のデング出血熱を導く可能性があることである。従って、1型から4型全てに対する防御免疫を同時に誘導し得る4価ワクチンの開発が不可欠である。デング4価ワクチンの開発に関しては、弱毒ワクチン及びキメラワクチンを用いた試みが報告されているが、いずれもこれら感染性ワクチンの混合投与によるウイルス干渉の問題があり、4種のワクチンドーズをどのように調整するかが重要なポイントとなっている。

DNAワクチンは、ウイルスゲノムの中で

免疫原性に重要とされる遺伝子のみをベクタープラスミドに組込んで作製する、有望なワクチン戦略の1つである。一部の遺伝子のみを使用するので製造過程における感染の危険性は無く、細菌を増殖させて生産するため低コストである。また、耐熱性であり低温条件で輸送する必要が無い。DNAワクチンが特にデング4価ワクチンに適すると考えられるのは、感染性ワクチンの混合投与にみられるウイルス干渉の問題がなく、また比較的長期に免疫応答を誘導する特徴を有するからである。

フラビウイルスは、膜蛋白 (M) 及びエンベロープ蛋白 (E) を表面にもつエンベロープがヌクレオカプシドを包む構造をしている。我々の研究室では、日本脳炎 (JE) をモデルとしてprM及びE遺伝子が遺伝子導入型ワクチンに用いるべき最も効力の高い遺伝子の組み合わせであることを明らかにしてきた。それはprM及びE遺伝子を導入

した細胞が、免疫原性の高い細胞外粒子 (EP) を産生、放出するためである。EP は、直径約20 nmの、ヌクレオカプシドを含まない空のウイルス様粒子で、prM/M及びEを含む脂質二重膜から成る。これまでに、日本脳炎ウイルスあるいはデング2型ウイルスのprM及びE遺伝子を組み込んだDNAワクチンを作製し、マウスに中和抗体を誘導することを証明してきた。

DNAワクチンの防御誘導機構の中で、抗原産生に関する部分は未だ完全には解明されていない。DNAワクチンをジーンガンにより投与した皮膚細胞においてウイルス抗原の発現が組織化学的染色により証明され、また、筋肉内に接種した遺伝子の発現がリポータージーンを用いて証明された。しかし、接種した筋肉細胞内で産生されるウイルス抗原量に関する報告は我々の知る限りではなされておらず、ピコグラムからナノグラム範囲の抗原が産生されているであろうことが推測されているのみである。*in vivo*でのウイルス抗原産生量を解明することは、DNAワクチンによる免疫誘導機構の解明及び混合ワクチン、特にデング4価DNAワクチンのドーズ調整のために有益な情報となる。

今回、日本脳炎、デング2型およびデング1型に対する3種のDNAワクチンを用いて、*in vivo*及び *in vitro*における抗原産生能とマウスにおける中和抗体誘導能の関係を調べた。

B. 研究方法

DNAワクチン: 日本脳炎ウイルス (JEV) 中山株、デング2型ウイルス (DENV2) ニューギニアC株またはデング1型ウイルス (DENV1) 望月株の prM/E 遺伝子を pcDNA3ベクターに組み込んで作製したプラスミド (それぞれ pcJEME、pcD2ME または pcD1ME) を用いた。

トランスフェクション: Vero細胞に2.0 µgのプラスミドDNAを、リポフェクトアミン試薬 (Life Technologies) を用いてトランスフェクトした。

E抗原量の測定: サンドイッチELISAを用いた。捕捉抗体として各ウイルスに対するウサギ過剰免疫血清で感作したプレート (Maxisorp、Nunc) を、サンプルと反応

させた後、検出抗体として各ウイルスに対するマウスモノクローナル抗体、アルカリフォスファターゼ標識抗マウスIgG抗体、パラニトロフェニルリン酸と順に反応させた。吸光度を測定し、標準抗原液で得られた吸光度と比較し抗原量を求めた。標準抗原液には、JEVまたはDENV2抗原連続発現細胞の培養液をポリエチレングリコール沈殿で部分精製したものをを用いた。

マウス実験: 4週令の雄ICRマウス (各群6から12匹) に、50 µgのプラスミドDNAを片脚の大腿部筋肉に通常の針付注射器もしくは針無注射器 (シマジェット、島津製作所) を用いて接種した後、4日目まで1日毎に筋肉を採取した。筋肉は、1%BSA、1.5%アプロチニン及び3.75%トリトンX-100を含むトリス緩衝生理食塩水 (pH7.5) 中で磨砕し、10%乳剤とした。同一個体から得られた未接種筋肉も同様に処理して、サンドイッチELISAにより吸光度を測定した。接種筋肉と未接種筋肉で得られた吸光度の差から、抗原量を計算した。また、中和抗体を調べるために、100 µgのDNAにより3週間隔で2回免疫したマウスを、初回免疫2週間後から約3週間毎に18週まで経時的に採血し、プール血清の中和抗体価を測定した。

中和試験: JEV及びDENV2に関してはそれぞれ中山株、NGC株を用いて90%プラーク減少法により測定した。DENV1では望月株を用いて90%フォーカス減少法により測定した。

(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

***in vitro*におけるE抗原産生能:** Vero細胞に2.0 µgの pcJEME、pcD2ME または pcD1MEをトランスフェクトした後、24時間毎に4日間培養液を採取し、培養液中のE抗原量を測定した (図1)。pcJEMEまたはpcD2MEをトランスフェクトした細胞から産生されるE抗原量は、2日目に最高値を示し、4日間を通してpcJEMEがpcD2MEの約10倍量のE抗原を産生した。一方、pcD1MEにおけるE抗原量は4日目まで検出限界未満 (0.1 ng/ml未満) であった。これらの結

果は、*in vitro*におけるE抗原産生能がpcJEME>pcD2ME>pcD1MEの順であることを示す。

筋肉中及び血漿中のE抗原量：マウスの大腿部筋肉に、50 µgのプラスミドDNAを、針無注射器を用いて接種した。pcJEMEは、12匹のマウスに接種し、1日に3匹ずつ4日間にわたり、両脚の大腿部筋肉を採取した。pcD2ME及びpcD1MEについては、それぞれ6匹のマウスに接種し、1日目に3匹、2-4日目に1匹ずつ筋肉を採取した。採取した筋肉の10%磨砕液中のE抗原量をELISAにより測定した(図2)。対照として、1群3匹のマウスに、pcJEMEを通常の針付注射器で、あるいはpcDNA3を針無注射器で接種し、翌日に筋肉を採取した。

pcJEME接種マウスにおいて、針付注射器を用いて接種した場合E抗原は検出されなかったものの、針無注射器を用いた場合には抗原が検出された。E抗原量は接種後1日目に最高値(約1.0 ng/ml)を示し、その後徐々に減少し、接種後4日目には検出されなかった。しかし、pcD2ME、pcD1ME及びpcDNA3を接種した筋肉においてE抗原は検出されなかった。また、血漿中E抗原量は全てのマウスで検出限界未満であった。

以上の結果より、pcJEMEを接種した筋肉細胞におけるE抗原の産生が証明された。pcD2ME及びpcD1MEに関しても、同様に筋肉細胞内でE抗原を産生していると考えられるが、産生量が少なくELISAの検出レベル未満であったと考えられる。通常の針付注射器では検出されなかった抗原が針無注射器で接種した場合に検出されたことは、針無注射器投与によりDNAがより多数の細胞中に取込まれたことを示唆する。

中和抗体誘導能：マウスに100 µgのpcJEME、pcD2MEまたはpcD1MEを3週間隔で2回、針付または針無注射器で大腿部に接種し、免疫から2週間後に採血し、プール血清にして中和抗体価を測定した(図3)。

pcJEMEまたはpcD2MEを接種したグループでは、投与方法に関わらず1回目の免疫から5週目に中和抗体価が最高値を示した。その後、中和抗体価は低下したが、pcD2MEを針無注射器で接種したグループでは、18週目まで最高値が維持された。一方、pcD1MEで免疫したグループにおいては、

両投与方法において、pcJEMEまたはpcD2MEで免疫したグループに比べ3週間遅れて(8週目)、中和抗体価が最高値を示し、18週目まで維持された。

この結果、針無注射器で接種したグループでは、5週目まではDNAワクチン間で誘導される中和抗体価に大きな差がみられたが、8週目にpcD1MEの抗体価がpcD2MEの抗体価と等しくなり、その後、14週目にはpcJEME、pcD2ME及びpcD1ME全ての抗体価が等しくなった(1:640)。一方、針付注射器で接種したグループにおいても、5週目に誘導された中和抗体価は、pcJEMEとpcD1MEの間に32倍の差があったが、18週後には4倍差まで減少した。

以上の結果より、免疫後初期には3種類のDNAワクチン間で中和抗体誘導能に大きな差(pcJEME>pcD2ME>pcD1ME)がみられるものの、免疫後の時間経過に伴い、その差は小さくなることが示された。

D. 考察

*in vitro*及び*in vivo*におけるprM/E遺伝子のEP産生能は、その遺伝子由来するウイルスの増殖性に関連することが示された。すなわち、感染培養液中のウイルス力価とトランスフェクトした細胞から発現されるE抗原量はおよそ、JEVにおいて 10^8 PFUと100 ng/ml、DENV2において 10^6 - 10^7 PFUと10 ng/ml、またDENV1において 10^5 - 10^6 PFUと0.1 ng/ml未満である。これは、EPの生合成過程がウイルス粒子の形態形成に類似するためと考えられる。

針無注射器接種法は、DNAワクチンの中和抗体誘導能を増強する効果的投与方法である。小さいノズルからのジェット噴射により、通常の針付注射法より多くの細胞にDNAが取込まれ、その結果、多量の抗原が産生されるためと思われる。インディアンリンクを針無注射器を用いてマウスの大腿部に接種した実験において、筋肉が広範囲にわたって染色されていることが示された。

3種類のDNAワクチン(pcJEME、pcD2ME及びpcD1ME)を比較することにより、*in vivo*、*in vitro*共にE抗原の産生量が多いほど、免疫初期に高い中和抗体が誘導されることが証明された。しかし、抗原産生能の異なるDNAワクチンでも、免疫

後の時間経過に伴い、誘導される中和抗体価の差は小さくなることが示された。これは、pcJEMEにおいて示されたように、筋肉内の抗原産生は1日目以降減少するが、リポーター遺伝子を用いた他の報告で証明されているように、一部の細胞では長期に抗原を発現し続けるためと考えられる。持続的抗原産生は、本研究においても中和抗体価が1回目の免疫後11-18週間にわたって同レベルに維持されていることから推察される。

今回、針無注射器を用いることで、これまで測定できなかった *in vivo* におけるDNAワクチンの抗原産生量の測定が可能となり、DNAワクチンの抗原産生能と中和抗体誘導能との量的関係が証明された。これは混合ワクチン、特にデング4価DNAワクチンにおける投与量の調節に重要な知見である。しかし、免疫初期を除いては、EP産生レベルの差が *in vitro* で最大1,000倍以上を示す3種類のDNAにおいて、マウスに誘導する中和抗体レベルが4倍以内であった。すなわち、4価DNAワクチンにおける投与量調整は、弱毒及びキメラ4価ワクチンほど厳密に考慮する必要は無いかもしれない。本研究で明らかにされた知見は、デング4価DNAワクチン開発に重要な情報になると考えられる。

E. 結論

3種のフラビウイルスDNAワクチン (pcJEME、pcD2ME、pcD1ME) を比較した結果、*in vivo* または *in vitro* においてE抗原の産生量が多いほど、免疫後初期に高い中和抗体が誘導されることが明らかとなった。しかし、その差は時間経過に伴い減少し、デング4価ワクチン作製におけるDNAワクチンの長所と考えられた。

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

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* 21, 1826-1832 (2003)

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* 21, 2338-2345 (2003)

Chiyoko Nukuzuma, Naoko Ajiro, Carl J. Wheeler, and Eiji Konishi: Enhancing Effect of Vaxfectin on the Ability of a Japanese Encephalitis DNA Vaccine to Induce Neutralizing Antibody in Mice. *Viral Immunology* 16, 183-189 (2003)

Eiji Konishi, Naoko Ajiro, Chiyoko Nukuzuma, Peter W. Mason, and Ichiro Kurane: Comparison of protective efficacies of plasmid DNAs encoding Japanese encephalitis virus proteins that induce neutralizing antibody or cytotoxic T lymphocytes in mice. *Vaccine* 21, 3675-3683 (2003)

Eiji Konishi, Aya Terazawa and Atsuko Fujii: Evidence for antigen production in muscles by dengue and Japanese encephalitis DNA vaccines and a relation to their immunogenicity in mice. *Vaccine* 21, 3713-3720 (2003)

Eiji Konishi, Mizue Shoda and Takashi Kondo: Prevalence of antibody to Japanese encephalitis virus nonstructural 1 protein among racehorses in Japan: indication of natural infection and need for continuous vaccination. *Vaccine* 22, 1097-1103 (2004)

2. 学会発表

Eiji Konishi, Aya Terazawa and Jun-ichi Imoto: Combined immunization with DNA and protein vaccines against Japanese encephalitis or dengue synergistically increases their own

immunogenicity in mice. The 37th Joint Viral Diseases Panel Meeting US-Japan Cooperative Medical Science Program. Houston (2003) .

石川知弘、小西英二：日本脳炎ウイルスに対する自然抗体の基礎的研究。第 38 回日本脳炎ウイルス生態学研究会 (2003)。

正田瑞恵、石川知弘、近藤高志、小西英二：日本脳炎ウイルスに対するウマ血清中 NS1 抗体測定法の確立及び疫学調査への応用。第 38 回日本脳炎ウイルス生態学研究会 (2003)。

井本淳一、寺澤文、小西英二：フラビウイルス DNA ワクチン及び蛋白ワクチンの同時投与による中和抗体誘導能の上昇。第 38 回日本脳炎ウイルス生態学研究会 (2003)。

小西英二：フラビウイルス病に対する DNA ワクチンの開発。第 1 回 DNA 及び新型ワクチン研究会 (2003)。

正田瑞恵、近藤高志、小西英二：日本脳炎ウイルス NS1 抗体測定の ELISA について。第 10 回トガ、フラビ、ペスチウイルス研究会 (2003)。

山中敦史、小西英二：日本脳炎ウイルス prM/E 発現 Vero 細胞において中性 pH で誘導される融合現象について。第 10 回トガ、

フラビ、ペスチウイルス研究会 (2003)。

正田瑞恵、石川知弘、近藤高志、小西英二：日本脳炎ウイルスに対するウマ血清中 NS1 抗体測定法の確立及び疫学調査への応用。第 51 回日本ウイルス学会学術集会・総会 (2003)。

井本淳一、小西英二：日本脳炎 DNA ワクチンおよび蛋白ワクチンの針無注射器を用いた混合投与がマウスに誘導する中和抗体レベルの上昇。第 51 回日本ウイルス学会学術集会・総会 (2003)。

小西英二：フラビウイルス DNA ワクチンの抗原産生能とマウスにおける中和抗体誘導能との関係。第 51 回日本ウイルス学会学術集会・総会 (2003)。

矢川京子、石川知弘、小西英二：Vero 細胞を用いたフラビウイルス持続感染系の確立と特性解析。第 51 回日本ウイルス学会学術集会・総会 (2003)。

H. 知的財産権の出願・登録状況

国内特許

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 同時投与方法」

発明者：小西英二 (2003)

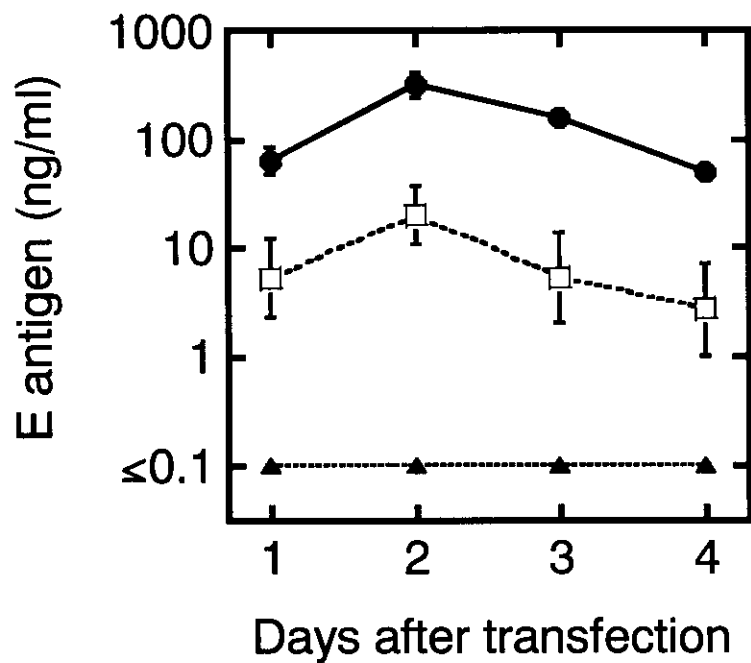


図1。 *in vitro*におけるE抗原産生能の比較。直径35mmのディッシュに成育させた単層Vero細胞に2.0 μg のpcJEME(●)、pcD2ME(□)もしくはpcD1ME(▲)をトランスフェクトした。2mlの培養液で維持し、4日目まで24時間毎に100ulを採取し、抗原量をELISAにより測定した。このE抗原量は、発現細胞率に基づき換算した。エラーバーは、3枚のディッシュで得られた値の標準誤差を示す。

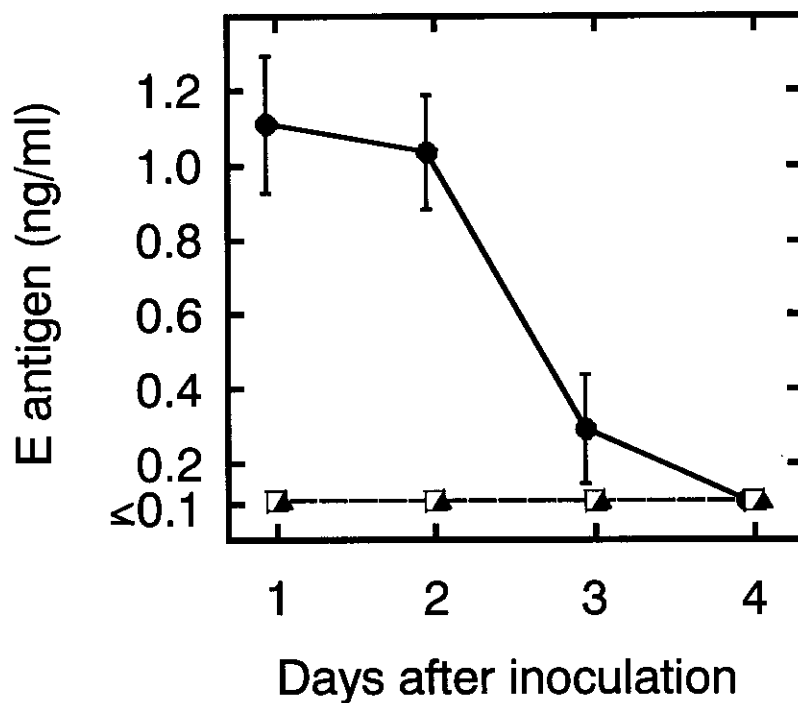


図 2。マウス筋肉内における E 抗原産生能の比較。50 μg の pcJEME (●)、pcD2ME (□) もしくは pcD1ME (▲) を針無注射器を用いて接種したマウスの大腿部の筋肉を 4 日目まで経日的に採取し、10%磨碎液に含まれる抗原量を ELISA により測定した。DNA は片脚の大腿部に投与し、同一個体の接種していない側の筋肉で得られた吸光度に基づき、E 抗原量を換算した。エラーバーは、3 枚のディッシュで得られた値の標準誤差を示す。

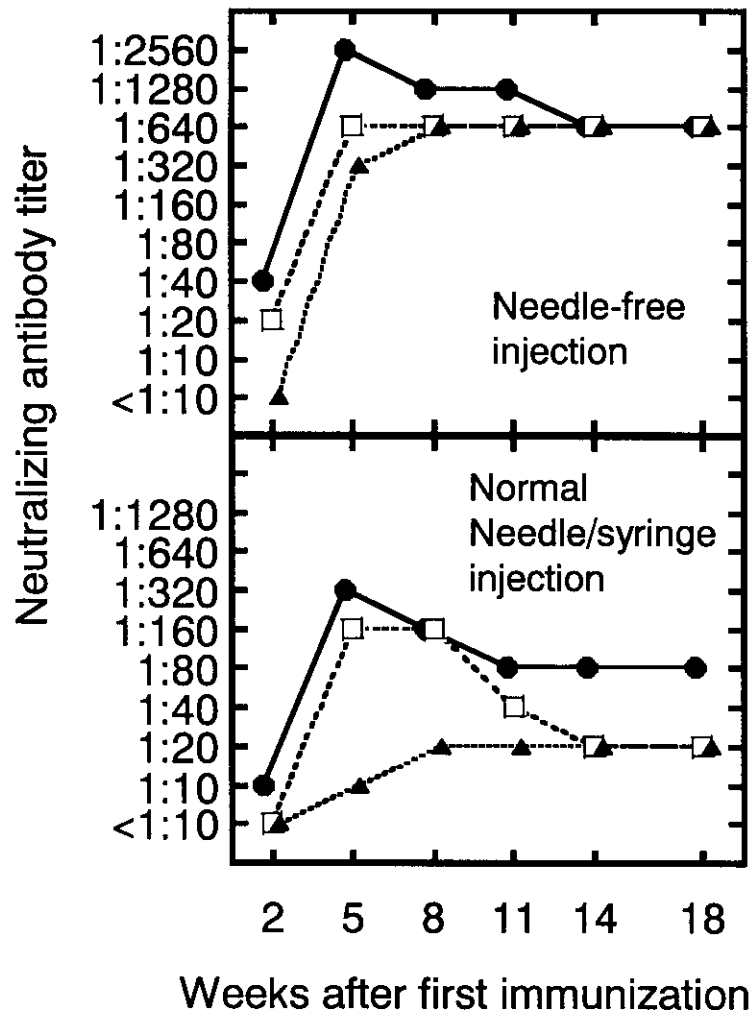


図3。マウスにおける中和抗体誘導能の比較。100 μ gのpcJEME (●)、pcD2ME (□) もしくはpcD1ME (▲) を、針無注射器 (上のパネル) または通常の針付注射器 (下のパネル) を用いて、1群6匹の4週令のICRマウスに、3週間隔で2回接種した。最初の免疫後2週から18週まで採血し、プール血清の中和抗体価を90%ブランク減少法により測定した。

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, 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	<i>Vaccine</i>	21	1826-1832	2003
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	<i>Vaccine</i>	21	2338-2345	2003
Chiyoko Nukuzuma, Naoko Ajiro, Carl J. Wheeler, and Eiji Konishi	Enhancing effect of Vaxfectin on the ability of a Japanese encephalitis DNA vaccine to induce neutralizing antibody in mice	<i>Viral Immunology</i>	16	183-189	2003
Eiji Konishi, Naoko Ajiro, Chiyoko Nukuzuma, Peter W. Mason, and Ichiro Kurane	Comparison of protective efficacies of plasmid DNAs encoding Japanese encephalitis virus proteins that induce neutralizing antibody or cytotoxic T lymphocytes in mice	<i>Vaccine</i>	21	3675-3683	2003
Eiji Konishi, Aya Terazawa and Atsuko Fujii	Evidence for antigen production in muscles by dengue and Japanese encephalitis DNA vaccines and a relation to their immunogenicity in mice	<i>Vaccine</i>	21	3713-3720	2003
Eiji Konishi, Mizue Shoda and Takashi Kondo	Prevalence of antibody to Japanese encephalitis virus nonstructural 1 protein among racehorses in Japan: indication of natural infection and need for continuous vaccination	<i>Vaccine</i>	22	1097-1103	2004

抗体可変部位をコードする遺伝子配列による ハイブリドーマクローンの群別法

分担研究者 山岡政興（兵庫県立健康環境科学研究所センター）
共同研究者 小西英二（神戸大学医学部医療基礎学講座）

研究要旨 デング4価ワクチンの安全性をワクチンの誘導する抗体の側からクローンレベルで評価するシステムを構築するためには、ワクチンをマウスに免疫後、作製したハイブリドーマの抗体可変部のシーケンス配列を群別解析する必要がある。そこで、実験マウスで生産される数多くのハイブリドーマの群別をより効率に行える方法を市販のプライマーを用いることによって検討した。マウスの免疫グロブリン可変部を増幅するために用意された17種類のプライマーをプロトコールに従った個々のプライマーペアによるPCR、あるいは複数単位で用いたマルチプレックスPCRを試みた。その結果、H鎖及びL鎖のそれぞれの可変部を増幅できること、増幅産物はダイレクトシーケンス法によって直接塩基配列が確定できることが明らかになった。しかしながら、すべてのハイブリドーマに適用するには更なる検討が必要なることも示された。一方、現時点では、用意されたプライマーによるPCR反応のパターンからの群別法も検討に値することが示された。

A. 研究目的

デング弱毒4価ワクチンの臨床試験が進行中であるが、その安全性についての検討は不十分である。それは、中和抗体を保有しているにもかかわらず、発症した例が最近報告されてきたからである。この点を明らかにするためには、クローンレベルで抗体の性質を調べる必要がある。

ところが、通常のモノクローナル抗体の作製は、抗体のcompetition assayやcharacterizationによるグループ分けが障壁となり、多くの数のマウスを調べることができなかつた。そこで、抗体可変部位の塩基配列を調べることによりグループ分けを行う可能性を探るため、市販のプライマーセットを用いて抗体可変部位遺伝子のクローニングからシーケンシングまでの過程を検討することを研究目的とした。

B. 研究方法

ハイブリドーマ：日本脳炎ウイルス、中山株のNS1により免疫したマウスの脾臓細胞から作製した3種類のハイブリドーマ2D5、5G2、9F12（矢川ら、未発表）

を使用した。これらの免疫グロブリン(Ig)のクラスはIgG1で、light chainは、kappa鎖である。

プライマーセット：マウスの免疫グロブリン可変部領域をPCRで増幅するためのプライマーは市販のIg-Primer Sets(Novagen社)を用いた。このセットには、IgM、IgGのheavy chain(H鎖)用の5' leader primerとしてAからFまでの6種類及びlight chain(L鎖)、kappa用にAからGまで7種類とlambda用の1種類の合計13種類のプライマーが用意されている。3' constant region primerにはIgM、IgGのH鎖用、L鎖、kappa用およびlambda用としてそれぞれ1種類ずつの合計4プライマーから構成され、セットとしてのプライマー総数は17種類からなっている。

ところで、セットに含まれるH鎖増幅用のC~F及びL鎖増幅用のD~Gの5' leader primerは、それぞれ2~4種類のプライマーで構成されており、H鎖増幅用の5' leader primerは総計で15種類、L鎖増幅用は、16種類のプライマーからなっている。

細胞からRNAの抽出：一旦、凍結保存

(-80°C)したハイブリドーマ細胞を用いた。RNAの抽出は、RNeasy Mini Kit (Qiagen社)を用いて行った。

cDNA 合成: ハイブリドーマから抽出された RNA を鋳型にして、Ready-To-Go You-Prime First-Strand Beads (アマシャムファルマシアバイオテック社)を用い、37°C、60分で合成させた。プライマーは random primer (pd(N)6)を使用した。

PCR: 反応条件は、Ig-Primer Sets (Novagen社)に準拠して行った。すなわち、熱変性・アニール・伸長反応が H鎖及び L (kappa) 鎖に対する 5' leader primer のうち、A と B プライマーでは、94°C、1分、50°C、1分、72°C、2分を 40 サイクル後、72°C で 6 分反応させた。一方、C~G プライマーはアニール条件は、60°C で行った。反応液は Ex premix (宝バイオ)を用いた。

ところで、マウスの免疫グロブリン可変部領域を解析する Novagen 社のフローチャートでは、PCR 増幅産物を一旦ベクターに組込んでから DNA シークエンシングを行うことになっているが、迅速性を重視する今回の実験目的から、ベクターに組込む過程をスキップして、PCR 産物から直接ダイレクトシークエンスを行う作戦を考えた。さらに、PCR 過程の省力化を考慮し、Novagen 社のプロトコールにはないが、H 鎖及び L (kappa) 鎖に対する 5' leader primer の A と B、C-F あるいは C-G をミックスした multiplex PCR を試みた。反応条件は、市販プロトコールのおおりの AB と C~G の PCR におけるアニールの温度条件が異なることから別々におこなった。

DNA シークエンシング: PCR 産物は、QIAquick PCR purification Kit (Qiagen社)で精製し、BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit (パーキンエルマー社)を用い、プロトコールにしたがって反応後、反応液を DyeEx 2.0 Spin Kit を用いて精製し、ABI PRISM 310 Genetic Analyzer を用いてシークエンシングを行った。

C. 研究結果

PCR によるハイブリドーマの群別: ハイブリドーマ 2D5、5G2、9F12 のそれぞれについて、H 鎖、6 種類及び L (kappa) 鎖 7 種類の 5' leader primer ごとに PCR をおこない、さらに 5' leader primer の AB、C-F、C-G ごとにマルチプレックス PCR を行った。5' leader primer の表記で図 1 および表 1 にまとめて示す。表 1 には、PCR 反応の結果を生成物の泳動上の強弱

により順に、一、w、1 から 4 までスコア化して示した。

ハイブリドーマ 2D5 は、今回使用した市販のプライマーセットで H 鎖及び L (kappa) 鎖の総計 13 プライマーペアの何れかに反応が見られた。一方、5G2 及び 9F12 は、L (kappa) 鎖においては A~G の何れかのプライマーに強い増幅が見られたが、H 鎖においては、5' leader primer の B に弱いながら反応が認められたものの、その他に明確な増幅産物を得られなかった。

ところで、ハイブリドーマ 2D5、5G2、9F12 のそれぞれについて、今回用いたプライマーに対する PCR の反応パターンは、3 種類ともすべて異なっていた (表 1)。

H 鎖及び L (kappa) 鎖に対する 5' leader primer の A と B、C-F あるいは C-G をミックスした multiplex PCR の結果、何れかの個々のプライマーペアに反応のあったプライマーミックスでは必ず反応生成物が検出された (表 2)。

PCR 産物に対するダイレクトシークエンス: 2D5、5G2、9F12 ハイブリドーマに試みたマルチプレックス PCR において、反応生成物のスコアが 1 以上を示した 2D5 の H 鎖及び L (kappa) 鎖に対する 4 例の増幅産物、及び 5G2、9F12 それぞれの L (kappa) 鎖に対する 2 例ずつの増幅産物について、個々のプライマーペアを用いた PCR において反応の認められたプライマーを用いて、シークエンシングを試みた結果を、表 3 にまとめた。シークエンスの結果は十分解析可能、部分的に解析可能、解析不可能に分けて示した。

供試したハイブリドーマにおいて、マルチプレックス PCR での増幅産物を 3' constant region primer を用いたシークエンシングを試みた結果、8 検体の中 4 検体で十分解析可能であったが、残りの 4 検体は部分的に解析可能あるいは解析不能であった。部分的解析可能あるいは解析不能の 4 検体のうち、3 検体は個々のプライマーペアで PCR において反応のあったプライマーを使用したシークエンシングで十分解析可能であった。

3 種類のハイブリドーマで生成されたマルチプレックス反応物に対するシークエンス解析において、2D5、9F12 のように比較的スムーズに解析できるものと、5G2 のようにさらに検討が必要なものが存在することが明らかになった。

D. 考察