

厚生労働科学研究研究費補助金

新興・再興感染症研究事業

ウイルスベクターを応用したワクチン開発迅速化のための基盤的

技術開発の研究(H16－新興－17)

平成16年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 森本 金次郎

平成17(2005)年 3月

目次

I. 総括研究報告	
ウイルスベクターを応用したワクチン開発迅速化のための基 盤的技術開発の研究	1
主任研究者： 森本 金次郎	
II. 分担研究報告	
1. P 遺伝子欠損狂犬病ウイルスベクターの作製とその有用性	17
主任研究者： 森本 金次郎	
2. Green Fluorescent Protein (GFP) 遺伝子組換え狂犬病ウ イルスを利用した新規中和抗体測定法	25
主任研究者： 森本 金次郎	
3. 狂犬病ウイルス粒子に対するマクロファージの MAPK カス ケード活性化と免疫応答遺伝子の発現誘導	33
主任研究者： 森本 金次郎	
4. 日本脳炎ウイルス抗原を発現する組換え狂犬病ウイルス作 製のための日本脳炎ウイルス抗原遺伝子の増幅	38
分担研究者： 高崎 智彦	
5. 組み換え狂犬病ウイルスワクチン開発のためのデングウイ ルス遺伝子合成 RNA の作製および定量法の確立	44
分担研究者： 倉根 一郎	
6. センダイウイルスベクターの応用に関する研究	49
分担研究者： 加藤 篤	
7. サル痘ウイルス感染サルにおける症状, サイトカイン血症, およびウイルス血症とウイルスゲノム血症 —新規天然痘 ワクチン評価のための基礎的研究—	53
分担研究者： 西條 政幸	
8. 単純ヘルペスウイルス感染症に対するワクチンの検討	60
分担研究者： 錫谷 達夫	
9. ヘルペスウイルスワクチンの評価法の開発に関する研究	69
分担研究者： 井上 直樹	
10. ヒト Fab ライブラリーの構築と狂犬病ウイルス中和モノ クローナル Fab 抗体の選別	77
分担研究者： 西園 晃	

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）

総括研究報告書

ウイルスベクターを応用したワクチン開発迅速化のための基盤的技術開発の研究

主任研究者：森本金次郎（国立感染症研究所 ウイルス第一部 第三室 室長）

研究要旨：本研究はウイルスベクターを利用することにより、ワクチン開発を迅速化するような基盤的技術開発を行うものである。単独のウイルス培養では困難なワクチン開発における様々なステップ（抗体産生、診断技術、ワクチン評価法等）を、ウイルスベクターを利用することにより、克服できるような技術開発を目指している。又、個々のウイルスでなされた技術を其処に留まることなく広く応用できる技術として捉えながら研究開発を進めていくことである。

本年度の研究において以下の成果が得られた。1) 狂犬病ウイルスベクターを外来遺伝子発現ベクターとして用いる場合の利便性を考え、各種遺伝子を欠損した狂犬病ウイルスを作製し、その安全性、免疫原性に対する研究を行った。その手始めとして、P 遺伝子欠損狂犬病ウイルスを作製し、ワクチンとしての有用性を検討した。2) 組換え狂犬病ウイルスを利用した、ワクチン評価法への利用として、GFP 組換え狂犬病ウイルスを用いた中和抗体測定法の開発を行った。3) 狂犬病ウイルスは不活化ワクチン・生ワクチンであれ、優れた免疫賦活効果を有する。狂犬病ウイルス粒子がマクロファージに取り込まれる際の免疫応答関連遺伝子の発現変動を調べ、ケモカイン CXCL10 の産生誘導がおこることが示された。4) 外来ウイルス蛋白質発現狂犬病ウイルスとして、日本脳炎ウイルス抗原組換え狂犬病ウイルスの作製を開始した。中和抗体の標的抗原である prM と E 領域だけでなく、CTL エピトープをもつ NS3 領域もクローニングし、狂犬病ウイルスベクターへの組込みを行いつつある。又、5) デングウイルス遺伝子組換え狂犬病あるいはセンダイウイルス作製の前段階であるが、デングウイルス RNA の定量法を TaqMan RT-PCR 法により確立した。6) センダイウイルスベクターの外来ウイルス抗原遺伝子発現の利用として、インフルエンザウイルス HA 蛋白質発現センダイウイルスが作製された。センダイウイルス粒子中に取り込まれることが示され、HA 蛋白質に対する抗体産生や防御効果の結果が待ち望まれる。7) 痘そうワクチンの評価を行うための動物実験モデルとして、カニクイザルへのサル痘 Liberia 株感染実験系を用い、ワクチニア Lister 株のワクチン有効性を示す、評価法を確立した。ウイルス血症とウイルスゲノム血症の測定を行った。8) ヘルペスワクチンの新たな候補として、免疫からの回避機能が欠損した弱毒株の検討を行った。9) 単純ヘルペスウイルス (HSV) 及びサイトメガロウイルス (CMV) の糖蛋白質遺伝子をクローニングし、G 蛋白質欠損 VSV 粒子を利用したシュードタイプ粒子形成により、HSV の感染には gB, gD, gH, gL の 4 種類の糖蛋白質が必要であ

ることを示した。さらに CMV の gB 糖蛋白質がマウス白血病ウイルス (MLV) env 糖蛋白質と共存した形で VSV シールドタイプ粒子中に含まれる事が示され、中和抗体価の測定に供することが可能であることが示された。10) ファージディスプレイ法を用いて、狂犬病ワクチン接種のヒト末梢血リンパ球より、Fab フラグメントのライブラリーを構築、狂犬病ウイルスに対する中和抗体価を有する遺伝子のクローニングを行った。

分担研究者：

井上 直樹 (国立感染症研究所 ウイルス
第一部 第四室 室長)

加藤 篤 (国立感染症研究所 ウイルス
第三部 第三室 室長)

倉根 一郎 (国立感染症研究所 ウイルス
第一部 部長)

西條 政幸 (国立感染症研究所 ウイルス
第一部 第一室 主任研究官)

錫谷 達夫 (福島医科大学 微生物学教室
教授)

高崎 智彦 (国立感染症研究所 ウイルス
第一部 第二室 室長)

西園 晃 (大分大学医学部 感染分子病
態制御講座 教授)

A. 研究目的

ウイルスベクターとして使用可能な狂犬病ウイルス・センダイウイルスを用い、外来ウイルス抗原遺伝子を組込んだ組換えウイルスを作製、有用なワクチンのないウイルスに対する新たなワクチンの開発を目指す。ワクチン開発に不可欠な動物実験モデル系の開発、ワクチン評価法、抗体産生等の技術への応用も目指す。ウイルスベクターを利用することにより、有効な免疫原性を得られないワクチンや本来のウイルスワクチンでは困難である問題を克服するための基盤的な技術の開発を

目指す。

外来ウイルス遺伝子の発現に適したウイルスベクターとしての改良の一環として、増殖欠損狂犬病ウイルスを作製、ワクチンとしての有用性を検討した。HEP-Flury 株は末梢感染からの病原性の減弱した弱毒株であるが、現在は不活化ワクチンとして広く使用されている。発現ベクターとしての利用には安全性の面からの何らかの改良を加えなければならない。そこで、我々は遺伝子欠損ウイルスを作製し、そのベクターとしてあるいはワクチンとしての有用性を検討した。狂犬病ウイルスベクターを用いたワクチン開発のモデルとして、すでにワクチンの評価法が確立している日本脳炎ウイルスを抗原として選択し、従来の日本脳炎ワクチンと比べ、長所短所を検討することとした。又、デングウイルスにおいては有効な動物実験系が存在せず、ワクチンも開発されていないことから、組換えウイルスによるワクチン作製が有効な戦略となると考えている。弱毒化狂犬病ウイルスは生体内において優れた免疫賦活効果をもつことが知られており、他種の病原体抗原のためのアジュバント型ワクチンベクターとして応用するアプローチが試みられているが、そのメカニズムは調べられていない。末梢部位に接種された狂犬病ウイルス粒子の多くはマクロファージ系細胞によって取り込まれ処理されることが報告されている

ことから、まずはマクロファージへの感染及び増殖様式、並びに細胞内シグナル分子の活性化と免疫関連遺伝子の発現誘導を体系的に解析した。

さらにもうひとつのウイルスベクター系として、センダイウイルスベクターを利用する研究を行った。センダイウイルスはヒトに対してはほとんど病原性を示さないが、実験感染させたマウスには致死的な肺炎を起こすことから、呼吸器感染症のモデルとしてもよく使われている。既に様々な遺伝子欠損ベクターの開発が行われているセンダイウイルスでは、H5型インフルエンザウイルスのHAを組み込んだ組換えウイルスの作製を行った。

生物兵器として痘そう（いわゆる、天然痘）ウイルスが用いられる危険性が指摘され、我が国でも痘そうワクチンの再生産・備蓄が開始されている。我が国で備蓄されている痘そうワクチンはLC16m8株であり、比較的副作用の低いワクチンである。しかし、一般的に痘そうワクチンは脳炎や全身感染症などの副作用を一定の割合で引き起こす。そのため、副作用のない新規痘そうワクチンの開発が急務である。しかしながら、我が国では天然痘に対する新規ワクチンの評価は不可能である。そこでサル痘ウイルスをサルに感染させた系をモデルとして、感染性ウイルス血症レベル、light cycler-PCRによるウイルスゲノム血症の定量、臨床症状を調べた。これらを指標として、このモデルが新規開発ワクチンの評価法として有用か否かを検討した。

日本においてもHSVワクチンの必要性が求められている。HSVに対するワクチンとして、どのようなワクチンが理想的であるかを明らかにすることを目的に、マウスの動物実験系を用いて研究を行った。本研究では免疫

回避機能を欠損したウイルスが強い免疫を誘導するワクチン株となりうるか否か、さらにワクチンが誘導する免疫がHSVによって引き起こされるどの疾患に有効であるのかを検討した。

新規ワクチンの評価において中和抗体価の測定は必須である。しかしながら、バイオセーフティ上の理由から容易に培養できないウイルス、細胞培養系で増殖しないもしくは力価測定に時間と労力を必要とするウイルスも存在する。こうした場合に、緑色蛍光蛋白質（GFP）を発現する組換え体水泡性口内炎ウイルス（VSV）を用いて、当該ウイルスの糖蛋白質をエンベロープに持つVSVシュードタイプを作製し、それによりウイルスの中和抗体価の測定等を行うことが可能である。本研究ではこれらの点についてレトロウイルスとヘルペスウイルスをモデルに検討した。又、既に確立した中和抗体測定法がある狂犬病ウイルスにおいてはGFP遺伝子を持つ組換え狂犬病ウイルスを作製、それを中和抗体測定に使用することにより、高価な蛍光標識抗体を必要とせず、従来の方法と同様の信頼性を持つ方法を開発した。狂犬病ウイルスの曝露ワクチン接種はその咬傷の程度に応じて能動免疫（ワクチン）の投与と、より重篤な曝露の際には受動免疫（グロブリン）の同時投与が推奨されている。しかしながら、抗狂犬病グロブリン製剤は全世界的にも全く品薄で、その供給には以前より限界が指摘されている。コンビナトリアル・ライブラリー法およびフェージディスプレイ法を組合せることにより狂犬病ワクチン接種後のヒトボランティア末梢血リンパ球から、ヒト抗体Fabライブラリーを構築し、狂犬病ウイルスを特異的に中和する能力のあるFabクローンを選択し、グロ

ブリン製剤としての利用を目指している。

B. 研究方法

組換えウイルス作製：インフルエンザウイルス A/turkey/Ireland/1378/85 (H5N8)の赤血球凝集素(HA)遺伝子を RT-PCR 法によりクローニングし、センダイウイルスベクターに組み込み、組換えセンダイウイルス (SeV/tukH5)を作成した。P 遺伝子欠損狂犬病ウイルスは狂犬病ウイルスベクターの P 遺伝子領域を取り除き、P 蛋白質発現細胞にトランスフェクトして、産生させた。GFP 遺伝子組換え狂犬病ウイルスは狂犬病ウイルスベクターの G 遺伝子と L 遺伝子の間に GFP 遺伝子を挿入し、作製した。日本脳炎ウイルス感染細胞からの RT-PCR により、C 蛋白質

(380bp)、C 蛋白質から E 蛋白質 (2381bp)、prM 蛋白質から E 蛋白質 (2000bp)、prM 蛋白質から NS1 蛋白質 (3236bp)、NS1 蛋白質 (1235bp)、NS3 蛋白質 (1856bp) の各目的遺伝子をクローニングした。今後はこれらの遺伝子を狂犬病ウイルス・センダイウイルスベクターに導入し、日本脳炎ウイルス抗原組換えウイルスを作製する。VSV シュードタイプ

の作製には VSV の組換えウイルス作製法により、HSV gB, gD, gH, gL, VZV gB, gH, gL, gE, gI, gC, gM, gN と CMV gB, gH, gL, gO, gM, gN, gp42 などの糖蛋白遺伝子のクローニングを行いシュードタイプ粒子への取り込みを調べた。

P 遺伝子欠損狂犬病ウイルスを用いたマウス感染防御実験：P 遺伝子欠損ウイルスを生ワクチン（いわゆる半生ワクチン）として、腹腔内・筋肉内・鼻腔・口腔投与し、1-4 週間後に致死量の CVS 株を脳内あるいは筋肉内接種し、その後のマウスの生存率を測定した。

ヘルペスウイルスを用いたマウス感染実験：マウスを用いたヘルペス感染実験によるワクチン評価には HSV-1 野生株である VR-3 株、チミジンキナーゼ (Thymidine kinase; TK) 欠損株 VRTK-1 株、UL41 遺伝子欠損株 VR Δ 41 株、UL41 復帰変異株 VR Δ 41R 株を腹腔内投与し、4 週間後に、野生株 VR-3 株をチャレンジ感染させた。HSV-1 株のマウス体内での増殖は臓器採取後ウイルスのタイトレーションを行い決定した。

サル痘ウイルスを用いたカニクイザル感染実験：ワクチニア Lister 株をワクチンとして、サル痘 Liberia 株をチャレンジ感染させ、その病態を観察した。ウイルス血症はサル痘ウイルスによって形成されたプラーク数を測定し、ウイルスゲノム血症は Light cycler-polymerase chain reaction (LC-PCR) を用いて測定した。血中サイトカインの測定は interleukin (IL)-2, IL-4, IL-6, IL-10, Interferon (IFN)-gamma, TNF-alpha を ELISA 法により測定された。

マウスマクロファージ系細胞株 RAW264 を用いた狂犬病ウイルス取り込み実験：サイトカイン・ケモカイン遺伝子発現パターンの解析として、インターフェロン(IFN)- α 、IFN- β 、IFN- γ 、腫瘍壊死因子(TNF)- α 、インターロイキン(IL)-1 β 、IL-6、IL-10、IL-12、IL-18、顆粒球-マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)、トランスフォーミング増殖因子(TGF)- β 1、CXC ケモカインリガンド(CXCL)2、CXCL9、CXCL10、CXCL11、CC ケモカインリガンド(CCL)2、CCL3、CCL5 の遺伝子発現を半定量 PCR 法により測定した。ケモカイン CXCL10 蛋白質の発現は ELISA 法により定量し、Mitogen-activated protein kinase (MAPK)リン酸化は特異的抗体を用いて定量した。

狂犬病ウイルス中和モノクローナル抗体

Fab のクローニング：末梢血リンパ球からのヒト V_H/κ Fab ライブラリーの構築、ファージライブラリーのパンニング（生物学的濃縮）、ヤギ抗ヒト IgG F(ab')₂ を抗原とした ELISA 法にてヒト型可溶性 Fab 産生クローンを選別した。選別した Fab 標品による狂犬病ウイルス中和試験、狂犬病ウイルスへの結合能、中和活性を示す Fab 標品の抗原特異性を調べた。

（倫理面への配慮）

動物実験は各研究施設の動物実験委員会による審査を受け承認を得た後行われた。ヒト検体を用いる研究は各研究機関の審査を受け倫理委員会の承認を得た後行われた。

C. 研究結果

1) 狂犬病ウイルスベクターの利便性を高めるため、まずは P 遺伝子欠損狂犬病ウイルスを作製し、その増殖速度、転写産物の解析、ウイルス蛋白質の産生等を調べた。ウイルスの増殖、ウイルスタンパクの産生量は P 蛋白質を供給するための P 蛋白質発現細胞中で発現している P 蛋白質の量に依存していることが分った。さらに、P 遺伝子欠損ウイルスのワクチン（いわゆる半生ワクチン）としての効果を検討し、腹腔内あるいは筋肉内に接種した場合、十分な防御効果を示したが、鼻腔接種、口腔接種では十分な防御効果は得られなかった。

2) H5 型のインフルエンザウイルスの HA 遺伝子をセンダイゲノムの再上流の位置に発現ユニットとともに組込んだ組換えセンダイウイルス (SeV/tukH5) を作成した。SeV/tukH5 感染細胞は、インフルエンザウイルスに対する抗体で陽性に染まり、HA 蛋白質を産生していることが示された。HA 分子は、培養細

胞ではトリプシン非存在下にもかかわらず HA1 と HA2 に開裂していた。

3) 組換えウイルスの発現抗原として、日本脳炎ウイルス及びデングウイルスの遺伝子を検討している。日本脳炎ウイルス感染細胞からの RT-PCR により、C 蛋白質 (380bp)、C 蛋白質から E 蛋白質 (2381bp)、prM 蛋白質から E 蛋白質 (2000bp)、prM 蛋白質から NS1 蛋白質 (3236bp)、NS1 蛋白質 (1235bp)、NS3 蛋白質 (1856bp) の各目的遺伝子を得ることができた。今後はこれらの遺伝子を狂犬病ウイルスベクターに導入し、日本脳炎ウイルス抗原組換え狂犬病ウイルスを作製する。

4) 組換えウイルス作製の技術を利用し GFP 遺伝子を組み込んだ二つの研究を行った。一つは GFP 遺伝子組換え狂犬病ウイルスを用いて、抗体の中和測定を行う方法で、従来の方法の改良法である。もう一つは VSV の G 蛋白質遺伝子の代わりに GFP 遺伝子を組み込んだ系に他種のウイルス糖蛋白質を取り込ませるシュードタイプウイルスの作製を行い、この組換えシュードタイプウイルスを利用し、本来のウイルスを用いた中和抗体測定法が困難な場合の代替法の開発である。従来より行われている RFFIT 法と GFP の発現による蛍光 positive 細胞を観察する新規 GFP 法を用いて、タイ赤十字において中和抗体価を測定した。ヒト血清、ウマ血清、イヌ血清とも両法の値に強い相関関係が示された。HSV 糖蛋白質によるシュードタイプの実験では、4 つの糖蛋白質 (gB, gD, gH, gL) 全てが発現された場合にのみ感染性のあるシュードタイプが産生されることを見出した。VZV、CMV 糖蛋白質によるシュードタイプの実験では、VZV gB, gH, gL, gE, gI, gC, gM, gN と CMV gB, gH, gL, gO, gM, gN, gp42 などの糖蛋白質遺伝子のクローニング

を行い、これらの CMV もしくは VZV 糖蛋白を様々に組合せて発現させ感染性のあるシュードタイプウイルスの作製を試みたが現在までのところ HSV と同等レベルの感染性を有するものは得られていない。MLV env と CMV gB によるシュードタイプの実験より、gB がシュードタイプ粒子中に含まれているかを確認した。CMV gB は本来の CMV 粒子中に含まれるのと同様に、プロテアーゼで切断された 2 蛋白として検出された。CMV 陽性血清では感染が 20-95% の範囲で阻害された。この感染阻害は CMV Towne 株を用いて測定した中和抗体価に相関した。

5) 狂犬病ワクチン接種を受けたボランティアの末梢血リンパ球から、約 350-bp の軽鎖及び重鎖の可変領域部(V_L, V_H) DNA 産物を PCR 法にて増幅、さらに約 350-bp の軽鎖及び重鎖の定常領域部(C_L, C_H1)を含んだ 1500-bp の全長 Fab DNA 産物をクローニングした。構築したファージライブラリーを西ヶ原株 RV ビリオンに対してパンニングを行ったライブラリーからは 20 クローン、精製 RV-G 蛋白質に対してパンニングを行ったライブラリーからは 112 クローンが可溶性 Fab 産生クローンとして選別された。これら 132 クローンの Fab 抗体を含む大腸菌抽出液に関して抗ヒト IgG F(ab')₂ に対する ELISA 値が高値であった 15 クローンについて RV 中和活性評価を行った。Fab 標品 EP5G3 は 2 倍希釈で 76%、4 倍希釈で 20% の CVS 感染 focus を減少させた。Fab 標品 GD2D12 は 2 倍希釈で 57%、4 倍希釈で 41% の CVS 感染フォーカスを減少させた。RV 中和活性を示した Fab 標品 EP5G3 と GD2D12 はこれら 2 つの Fab は RV-G 蛋白質を認識することが推測された。また Fab EP5G3 と GD2D12 の V_H に関してはどちらも V_{HIII}

family 由来と推測されたが EP5G3 の V_L は V_{LIII} family、GD2D12 の V_L は V_{LI} family 由来と推測された。

6) 狂犬病ウイルスに対するマクロファージ RAW264 細胞のケモカイン遺伝子発現変化を調べた結果、対照群と比較して CXCL10 の発現が 200 倍以上増加することが分かった。他のケモカイン、サイトカイン遺伝子発現において大きな変動は観察されず、RV による CXCL10 発現誘導は RV 接種 12 時間以降に生じること、さらに UV 照射によって不活化したウイルス粒子を添加した場合にも同様の発現誘導が生じることが分かった。

7) カニクイザルとサル痘 Liberia 株感染系に、ワクチンとしてワクチニア Lister 株を用いた動物実験系を用いて、痘瘡ワクチンの動物実験モデル系及びワクチン効果検討系を確立した。サル痘 Liberia 株鼻腔内感染サル群は 10 日目以降に 10-20 個の水疱性皮膚病変が大腿部、臀部、顔部、背部に散見された。同時に食欲の低下、活動性の低下が認められた。ほぼ 10% の体重減少が観察され、感染後 16 日頃から症状の改善がみとめられた。サル痘 Liberia 株皮下感染サル群においては感染後 7 日目から食欲低下、活動性の低下などの症状が出現した。接種部位は 3 日後から発赤の伴う腫脹が認められ、徐々に潰瘍化してきた。多数の水疱性病変が出現し、2 匹の内 1 匹は感染後 10 日目に死亡した。一方、ワクチニア Lister 株鼻腔内免疫サル群には全くサル痘ウイルス感染によると考えられる症状は出現しなかった。

8) 単純ヘルペスウイルスに対するワクチンとして、どのようなワクチンが理想的であるかを明らかにすることを目的に、マウスの動物実験系を用いて研究を行った。生ワクチンとして病原性を持つ野生株 VR-3 株と免疫か

らの回避機能が欠損した弱毒株 VRΔ41 株、チミジンキナーゼ活性を欠損した弱毒株 VRTK-1 株、不活化ワクチンとして UV を照射して感染性を無くした VR-3 株を用いた。その結果、VRΔ41 株が最も強い免疫を誘導し、ワクチンとして優れていること、また、脳炎の予防にはウイルスが脳内に侵入し、増殖しなければならないことが分った。

D. 考察

狂犬病ウイルスベクター改良の一環として、遺伝子欠損ウイルスベクターの開発を行った。P 遺伝子欠損ウイルスは P 蛋白質発現細胞を用いることで、効率よく回収増幅できた。P 遺伝子欠損ウイルスの増殖速度は遅いが、これは P 蛋白質の供給が不十分なためと考えられる。より高濃度のワクチン接種が可能となるよう欠損ウイルス産生量の増加が検討課題である。P 蛋白質を高発現させる他の発現ベクターを用いることで、P 蛋白質の十分な供給が可能となるであろう。他の遺伝子欠損ウイルスの中で、M 遺伝子欠損ウイルスも有用な候補である。この欠損ウイルスは複製可能であるが、子孫ウイルスを放出することがない。この報告に述べてきた同じシステムを用いて、M 遺伝子欠損ウイルスの作製を行う予定である。

狂犬病ウイルスベクターを用いたワクチン開発のモデルとして、すでにワクチンの評価法が確立している日本脳炎ウイルスを抗原として選択した。従来の日本脳炎ワクチンと比べ、長所短所を検討する予定である。組換え狂犬病ウイルスワクチンを開発するにあたり、我々は日本脳炎不活化ワクチンに含まれる C 蛋白質から E 蛋白質までの遺伝子のみならず、

C 蛋白質、prM 蛋白質から E 蛋白質、prM 蛋白質から NS1 蛋白質、NS1 蛋白質、NS3 蛋白質の各領域を選択した。各抗原を発現する組換え狂犬病ウイルスと日本脳炎不活化ワクチンを比較することにより各抗原の抗原性、安全性等の検討が可能となり、より有効なワクチンの開発につながると考える。デングウイルスに対しては有効な動物実験系が存在せず、ワクチンも開発されていないことから、組換えウイルスによるワクチン作製が有効な戦略となるであろう。作製した組換え狂犬病ウイルスはマウスモデルを用いて抗原性及び安全性を明らかにしていくことにより、外来抗原発現組換え狂犬病ウイルスを用いたワクチン開発モデルを確立する。

ワクチン開発における弱毒化狂犬病ウイルスベクターの利点として、優れた免疫増強効果が挙げられる。狂犬病ウイルスによるマクロファージ活性化の特筆すべき点として、サイトカイン並びに CXCL10 以外のケモカインの遺伝子発現パターンにはほとんど影響を与えないことが挙げられる。ワクチンベクターとしてウイルスを用いる場合、接種部位における過剰なサイトカインストームは、炎症反応による細胞障害や抗ウイルス応答による抗原導入効率の減衰を招く。弱毒狂犬病ウイルスは、これらの負の効果を回避しながら、特定のケモカインの産生のみを部位特異的に誘導し、他種抗原に対する免疫を誘導するワクチンベクターとしての可能性を秘めていると考える。

また、センダイウイルスベクターを用いた研究では、インフルエンザウイルス HA 蛋白質を産生する組換え SeV(SeV/tukH5)を作製することができた。この組換え SeV が、インフルエンザウイルスに対する抗体を誘導するのか、また誘導させた抗体はインフルエンザ

ウイルスに対する防御効果を持つのかといった課題について今後検討する必要がある。

抗狂犬病ウイルス中和抗体 Fab の研究では、今後さらに中和活性が高いクローンを選別し、また選別したクローンについて Fc 部分を有する完全型の IgG 分子に変換し、補体活性化能やオプソニン活性化能を高めた分子を作製し、さらなる評価を行う予定である。

これまで使用されてきた痘そうワクチンに代わるより安全な痘そうワクチン開発のために欠かせない霊長類を用いたモデルを確立した。その症状、ウイルス血症、サイトカインの推移などを指標にして評価した。霊長類をモデルとした痘そうワクチンの評価のための動物実験モデルを開発したが、これとともに小動物を用いた痘そうワクチン評価システムの開発も欠かせない。

ヘルペスウイルス(HSV)の研究において、これまで少なくとも5つの因子が宿主の免疫から回避する機能を持っていることが明らかとなっており、この機能を失った変異ウイルスは弱毒化することが知られている。今回我々は、その1つUL41を欠損したウイルスをワクチンとして動物実験を行い、強い免疫を誘導する弱毒生ワクチン株候補であることを明らかにした。この弱毒化ならびに生ワクチン化の戦略は単純ヘルペスウイルスに限らず、免疫からの回避機構を持つ全てのウイルスに応用可能なものと予想される。今後、本研究課題で計画されているウイルスベクターを用いたワクチンによって、さらに問題を明らかにし、解決していきたい。

ヘルペスウイルス科に分類される各ウイルスの場合、ウイルスごとにその初感染及び再活性化の病態も潜伏感染の標的となる細胞の種類も異なる。公衆衛生の観点からワクチン

の開発が重要な疾病としては新生児ヘルペスと先天性サイトメガロウイルス(CMV)感染症がある。CMVについては、先天性感染の動物モデルやワクチン評価系の制約のため開発がすすんでいない。ワクチン評価の制約要因のひとつには、HSV以外のヘルペスウイルス群では、高力価の細胞フリーのウイルスが取りづらいことに加え、ウイルス増殖が遅くプラーク形成にも1週間単位で時間がかかるため、力価測定を必要とする中和抗体価測定などが治験にとって大きな負担となっていることが挙げられる。現在、HSV gB及びgD、CMV gB及びgHを発現するセンダイウイルスベクターや狂犬病ベクターを作製し、これらのベクターを用いてマウスを免疫する研究の準備を進めており、今回検討したシュードタイプによる中和抗体測定法を用いることにより迅速なワクチン評価ができるようになることが期待できる。

現時点ではまだ、個々のウイルスに特化した研究もあるが、今後分担研究者相互の活発な研究交流により、幅広いウイルスに応用できる基盤的技術として確立することを目指す。

E. 結論

本年度の研究において以下の点が明らかとなった。

- 1) 狂犬病ウイルスベクターより、P遺伝子欠損狂犬病ウイルスを作製し、ワクチンとしての有用性を検討し、防御効果のあることが示された。安全性の高い弱毒生ワクチンあるいは発現ベクターとなりえることが示された。
- 2) GFP組換え狂犬病ウイルスを用いた中和抗体測定法の開発を行い、現在広範に使用されているRFFIT法と変わらない測定法であることが示された。
- 3) 狂犬病ウイル

ス粒子がマクロファージに取り込まれる際の免疫応答関連遺伝子の発現変動を調べ、ケモカイン CXCL10 の産生誘導がおこることが示された。4) 外来ウイルス蛋白質発現狂犬病ウイルスとして、日本脳炎ウイルス抗原組換え狂犬病ウイルスの作製を開始した。5) デングウイルス RNA の定量法を TaqMan RT-PCR 法により確立した。6) センダイウイルスベクターの外来ウイルス抗原遺伝子発現の利用として、インフルエンザウイルス HA 蛋白質発現センダイウイルスを作製した。7) 痘そうワクチンの評価を行うための動物実験モデルとして、カニクイザルへのサル痘 Liberia 株感染実験系を用い、ワクチニア Lister 株のワクチン有効性を示す、評価法を確立した。8) ヘルペスワクチンの新たな候補として、免疫からの回避機能が欠損した弱毒株の検討を行った。この VR Δ41 株は弱毒生ワクチンとして優れた効果を発揮した。9) G 蛋白質欠損 VSV 粒子を利用したシュードタイプ粒子形成により、HSV の感染には gB, gD, gH, gL の 4 種類の糖蛋白質が必要であることを示した。さらに CMV の gB 糖蛋白質がマウス白血病ウイルス (MLV) env 糖蛋白質と共存した形で VSV シュードタイプ粒子中に含まれる事が示され、中和抗体価の測定に供することが可能であることが示された。10) ファージディスプレイ法を用いて、狂犬病ワクチン接種のヒト末梢血リンパ球より、Fab フラグメントのライブラリーを構築、狂犬病ウイルスに対する中和抗体価を有するヒト型 Fab 抗体遺伝子のクローニングに成功した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- Shoji, Y., Inoue, S., Nakamichi, K., Kurane, I., Sakai, T., Morimoto, K. Generation and characterization of P gene-deficient rabies virus. *Virology*, 318, 295-305 (2004).
- Nakamichi, K., Inoue, S., Takasaki, T., Morimoto, K., Kurane, I. Rabies virus stimulates nitric oxide production and CXC chemokine ligand 10 expression in macrophages through activation of extracellular signal-regulated kinases 1 and 2. *Journal of Virology*, 78, 9376-9388 (2004).
- Khawplod, P., Inoue, K., Shoji, Y., Wilde, H., Ubol, S., Nishizono, A., Kurane, I., Morimoto, K. A novel rapid fluorescent focus inhibition test (RFFIT) of rabies virus using a recombinant rabies virus visualizing a green fluorescent protein. *Journal of Virological Methods*, 125, 35-40 (2005).
- Hemachudha, T., Wacharapluesadee, S., Mittrabhakdi, E., Wilde, H., Morimoto, K., Lewis, R. A. Pathophysiology of human paralytic rabies. *Journal of Neurovirology*, 11, 93-100 (2005).
- Morimoto, K., Shoji, Y., Inoue, S. Characterization of P gene-deficient rabies virus. The propagation, pathogenicity and immunogenicity. *Virus Research*, in press (2005).
- Motoi, Y., Inoue, S., Hatta, H., Sato, K., Morimoto, K., Inoue, S., Yamada, A. Production of rabies neutralization antibody in hen's eggs using a part of the G protein expressed in *Escherichia coli*. *Vaccine*, in press (2005).
- Motoi Y., Inoue S., Hatta H., Sato K., Morimoto

- K., Yamada A. Detection of Rabies-Specific Antigens by Egg Yolk Antibody (IgY) to the Recombinant Rabies Virus Proteins Produced in *Escherichia coli*. *Japanese Journal of Infectious Diseases*, in press (2005).
- A. Kato, C. Cortese-Grogan, S. A. Moyer, F. Sugahara, T. Sakaguchi, T. Kubota, N. Otsuki, M. Kohase, M. Tashiro, and Y. Nagai. Characterization of the amino acid residues of Sendai virus C protein that are critically involved in its interferon antagonism and RNA synthesis down-regulation. *J Virol*. 76:7114-7124 (2004).
- Y. Nagai, and A. Kato. Accessory genes of the Paramyxoviridae, a large family of nonsegmented negative strand RNA viruses, as a focus of active investigation by reverse genetics, in press. *In* Y. Kawaoka (ed.), *Biology of Negative Strand RNA Viruses: The Power of Reverse Genetics*, Springer-Verlag GmbH and Co. KG, *Curr. Topic Microbiol. Immunol* 283:198-248 (2004).
- Saijo M, Tang Q, Shimayi B, Han L, Zhang Y, Asiguma M, Tianshu D, Maeda A, Kurane I, Morikawa S. (2004) Possible horizontal transmission of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus from a mother to her child. *Japanese Journal of Infectious Diseases* 57: 55-57.
- Niikura M, Maeda A, Ikegami T, Saijo M, Kurane I, Morikawa S. (2004) Modification of endothelial cell functions by hantaan virus infection: prolonged hyper-permeability induced by TNF-alpha of hantaan virus infected endothelial cell monolayers. *Archives of Virology* 149: 1279-92.
- Mizutani T, Fukushi S, Saijo M, Kurane I, Morikawa S. (2004) Phosphorylation of p38 MAPK and its downstream targets in SARS coronavirus-infected cells. *Biochemical Biophysical Research Communication* 319: 1228-1234.
- Mizutani T, Fukushi S, Saijo M, Kurane I, Morikawa S. (2004) Importance of Akt signaling pathway for apoptosis in SARS-CoV-infected Vero E6 cells. *Virology* 327: 169-74.
- Mizutani T, Fukushi S, Murakami M, Hirano T, Saijo M, Kurane I, Morikawa S. (2004) Tyrosine dephosphorylation of STAT3 in SARS coronavirus-infected Vero E6 cells. *FEBS letter* 577 (1-2): 187-92.
- Saijo M, Tang Q, Shimayi B, Han L, Zhang Y, Asiguma M, Tianshu D, Maeda A, Kurane I, Morikawa S. (2005) Recombinant nucleoprotein-based serological diagnosis of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus infections. *Journal of Medical Virology* 75: 295-299.
- Ando T., Yamashiro T, Sonoda YT, Mannen K, Nishizono A. (2005) Construction of human Fab library and isolation of monoclonal Fabs with rabies virus neutralizing ability. *Microbiology and Immunology* (in press)
- Men R, Yamashiro T, Goncalvez AP, Wernly C, Schofield DJ, Emerson SU, Purcell RH, Lai CJ. (2004) Identification of chimpanzee Fab fragments by repertoire cloning and production of a full-length humanized immunoglobulin G1 antibody that is highly efficient for neutralization of dengue type 4 virus. *Journal of Virology* 78: 4665-74.
- N. Inoue, T. Spira, L. Lam, J.L. Corchero, W. Luo.

- (2004) Comparison of serologic responses between Kaposi's sarcoma-positive and -negative men who were seropositive for both human herpesvirus 8 and human immuno-deficiency virus. *J. Med. Virol.* 74:202-206.
- L.T. Krug, V.P. Pozharskaya, Y. Yu, N. Inoue, M.K. Offermann. (2004) Inhibition of infection and replication of human herpesvirus 8 in microvascular endothelial cells by alpha interferon and phosphonoformic acid. *J. Virol.* 78:8359-71.
- V. Pozharskaya, L.L. Weakland, J.C. Zimring, L.T. Krug, E.R. Unger, A. Neisch, H. Joshi, T. Kroll T, N. Inoue, Offermann MK. (2004) The impact of viral interferon regulatory factor-1 expression on responsiveness to interferon alpha and the production of infectious human herpesvirus 8 by BCBL-1 cells. *J. Virol.* 78:6621-6635.
- S. Koyano, A. Araki, Y. Hirano, K. Fujieda, T. Suzutani, K. Yagyu, K. Muroho, N. Inoue. (2004) Retrospective diagnosis of congenital cytomegalovirus infection using dried umbilical cords. *Ped. Infect. Dis. J.* 23:481-482.
- Shigeru Tajima, Tomohiko Takasaki, Shigeo Matsuno, Mikio Nakayama, Ichiro Kurane. Genetic characterization of Yokose virus, a flavivirus isolated from the bat in Japan. *Virology* 332:38-44, 2005
- Masaru Kuwayama, Mikako Ito, Shinichi Takao, Yukie Shimazu, Shinji Fukuda, Kazuo Miyazaki, Ichiro Kurane, Tomohiko Takasaki. Detection of Japanese encephalitis virus genome in cerebrospinal fluids from meningitis patients in Japan. *Emerg. Infect. Dis.* 11(3):471-473, 2005
- Kaneko, H., S. Mori, O. Suzuki, T. Iida, S. Shigeta, M. Abe, S. Ohno, K. Aoki and T. Suzutani. The cotton rat model for adenovirus ocular infection: antiviral activity of cidofovir. *Antiviral Res.* 61:63-66 (2004)
- Yokota, S., N. Yokosawa, T. Okabayashi, T. Suzutani, S. Miura, K. Jimbow and N. Fujii. Induction of suppressor of cytokine signaling-3 by herpes simplex virus type 1 contributes suppression of interferon signaling pathway and replication of virus. *J. Virol.* 78: 6282-6286 (2004)
- Kimura, K., K. Ishioka, K. Hashimoto, S. Mori, T. Suzutani, T.L. Bowlin and S. Shigeta. Isolation and characterization of NMSO3-resistant mutants of respiratory syncytial virus. *Antiviral Res.* 61: 165-171 (2004)
- Murata, M., H. Gouda, K. Yano, S. Kuroki, T. Suzutani and Y. Katayama. An electrochemical device for the assay of the interaction between a dioxin receptor and its various ligands. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 14: 137-141 (2004)
- Hashimoto, K., B.S. Graham, S.B. Ho, K.B. Adler, R.D. Collins, S.J. Olson, W. Zhou, T. Suzutani, P.W. Jones, K. Goleniewska, J.F. O'Neal and R.S. Jr. Peebles. Respiratory syncytial virus in allergic lung inflammation increases Muc5ac and gob-5. *Am. J. Respir. Crit Care Med.* 170: 306-312 (2004)
- Hashimoto K, B.S. Graham, M.W. Geraci, G.A. FitzGerald, K. Egan, W. Zhou, K. Goleniewska, J.F. O'Neal, J.D. Morrow, R.K. Durbin, P.F. Wright, R.D. Collins, T. Suzutani, R.S. Peebles Jr. Signaling through the prostaglandin I₂

- receptor IP protects against respiratory syncytial virus-induced illness. *J. Virol.* 78: 10303-10309 (2004)
- Saijo, M., T. Suzutani, S. Morikawa and I. Kurane. Genotypic characterization of the DNA polymerase and sensitivity to antiviral compounds of foscarnet resistant HSV-1 derived from a foscarnet-sensitive herpes simplex virus type 1. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49: 606-611 (2005)
- Ito, M., Takasaki, T., Yamada, K., Nerome, R., Tajima, S. and Kurane I. Development and evaluation of Fluorogenic TaqMan reverse transcriptase PCR assays for detection of dengue virus types 1 to 4. *Journal of Clinical Microbiology* 42(12): 5935-5937, 2004.
- 森本金次郎、伊藤（高山）陸代：狂犬病ワクチン 日本臨床 増刊 臨床免疫（下）－基礎研究の進歩と最新の臨床－ 日本臨床社 印刷中（2005）
- 西條政幸（2004）サル痘ウイルス感染症. *臨床と微生物* 31:21-24.
- 西條政幸（2004）ウイルス性出血熱. *化学療法の領域* 20:224-228.
- 西條政幸, 森川茂, 倉根一郎（2004）クリミア・コンゴ出血熱. *ウイルス* 54:223-228.
2. 学会発表
- Shoji, Y., Kurane, I., Sakai, T., Morimoto, K. Generation and Characterization of P gene-deficient rabies virus. Fifth Japan-China International Congress of Virology, Osaka, Japan, June 10-11, (2004)
- Shoji, Y., Kurane, I., Sakai, T., Morimoto, K. Potential utility of P gene-deficient rabies virus as a live vaccine. Fourth World Congress on Vaccines and Immunisation, Tukuba, September 30 – October 3 (2004)
- Ito-Takayama, M., Shoji, Y., Kurane, I., Morimoto, K. Attenuated rabies virus, HEP-Flury strain, regains virulence in adult mice by single Glu333Arg substitution on glycoprotein. 38th US-Japan Joint Working Conference on Viral Diseases, Kyoto, Japan, December 6-8, (2004)
- Kato, A., C. Cortese-Grogan, S. A. Moyer, F. Sugahara, T. Sakaguchi, M. Tashiro, and Y. Nagai. Characterization of the amino acid residues of Sendai virus C protein that are involved in its interferon antagonism. Workshop on Replication and Cell Biology of Negative Strand RNA Viruses. Evanston, IL, USA June 12-16, 2004
- Saijo M, Tang Q, Kurane I, Morikawa S. Molecular epidemiology of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus infections in the Xinjiang Uygur Autonomous Region, P. R. China. 5th Japan-China Virology Conference. June, 2004, Osaka
- Saijo M. Crimean-Congo hemorrhagic fever in the Xinjiang Uygur Autonomous Region, P. R. China. Research activities towards the control of viral hemorrhagic fever (*University of Hokkaido*). June 2004, Sapporo
- Niikura M, Maeda A, Ikegami T, Saijo M, Kurane I, Morikawa S. Modification of endothelial cell functions by Hantaan virus infection: prolonged heperpermiability induced by TNF-alpha of Hantaan virus-infected endothelial cell monolayers. International Conference on Hantavirus infections. June 2004, Seoul, South

Korea

Saijo M. Crimean-Congo hemorrhagic fever in the Xinjiang Uygur Autonomous Region, P. R. China. US-Japan Cooperative Medical Science Program. Joint Panels Symposium on Vector-Borne Infectious Diseases and Control. December 2004, Kyoto

Yamashiro T, Ando T, Nishizono A. Construction of human $\gamma 1/\kappa$ library and isolation of monoclonal Fabs with rabies virus neutralizing ability. Fortieth Anniversary United State-Japan Cooperative Medical Science Program. December 2004, Kyoto

Nishizono A. Molecular epidemiology of rabies isolates in Southern Vietnam. 21st COE program Nagasaki Symposium on tropical and emerging infectious diseases and JSPS workshop on infectious diseases in Vietnam November 2004, Nagasaki

伊藤睦代、庄司洋子、倉根一郎、森本金次郎：狂犬病ウイルス HEP-Flury 株糖蛋白質の 1 アミノ酸変異による病原性の復帰 第 52 回日本ウイルス学会総会 2004 年 11 月 21-23 日 (横浜)

中道一生、齋木めぐみ、森本金次郎、倉根一郎：狂犬病ウイルス感染によるミクログリアの MAP キナーゼ活性化とケモカイン発現誘導 第 52 回日本ウイルス学会総会 2004 年 11 月 21-23 日 (横浜)

加藤篤、久保田耐、田代真人、永井美之：センドライウイルス C 蛋白質による抗インターフェロン効果 第 52 回日本ウイルス学会総会、神戸、2004 年 11 月

久保田耐、横沢紀子、横田伸一、藤井暢弘、田代真人、加藤篤：ムンプスウイルスによ

る STAT1 分解とは異なる経路を介した宿主 IFN 情報伝達阻害 第 52 回日本ウイルス学会総会、神戸、2004 年 11 月

村木優子、真鍋貞夫、福家 巧、石川豊数、加藤篤、田代真人、山西弘一、高橋理明：ムンプスウイルスの神経病原性評価法としてのマーマセット接種試験の妥当性について 第 52 回日本ウイルス学会総会、神戸、2004 年 11 月

坂口剛正、菅原文博、島津幸枝、加藤篤、井上 誠、永井美之、吉田哲也：センドライウイルス C 蛋白質は宿主因子 AIP1 と相互作用してウイルス出芽を促進する。第 52 回日本ウイルス学会総会、神戸、2004 年 11 月

立川(川名)愛、細谷紀彰、加藤篤、塩田達雄、永井美之、岩本愛吉：エプトープ欠乏 b2 ミクログロブリンと TAP 阻害タンパク質を用いた HIV-1 特異的 CD8 陽性 T 細胞への効率的な抗原提示法の開発 第 52 回日本ウイルス学会総会、神戸、2004 年 11 月

砺波一夫、栗原由紀子、佐藤崇裕、天野朋和、油谷浩幸、加藤篤、栗原裕基：Identification and functional analysis of Calpain6 as a molecule down stream to endothelin-1 signaling in branchial arch formation. 第 27 回日本分子生物学会年会、神戸、2004 年 12 月

西條政幸 母親から感染したと考えられるクリミア・コンゴ出血熱の 4 歳女児例. 第 36 回日本小児感染症学会, 2004 年 11 月, 東京
山田靖子, 水谷哲也, 高橋一朗, 福士秀悦, 西條政幸, 倉根一郎, 森川茂 SARS-CoV の継代培養による変異ウイルスの出現. 第 52 回日本ウイルス学会学術集会, 2004 年 11 月, 横浜

永田典代, 岩田奈織子, 長谷川秀樹, 福士秀

- 悦, 西條政幸, 森川茂, 佐藤由子, 佐多徹太郎 マウスとラットを用いた SARS-CoV 感染モデルの作製. 第 52 回日本ウイルス学会学術集会, 2004 年 11 月, 横浜
- 西條政幸, 福士秀悦, 荻野利夫, 田口文広, 水谷哲也, 松山州徳, 倉根一郎, 田代真人, 森川茂 SARS コロナウイルスの組換え核蛋白を抗原とした ELISA 法の開発を評価. 第 52 回日本ウイルス学会学術集会, 2004 年 11 月, 横浜
- 森川茂, 長谷川秀樹, 西條政幸, 前田秋彦, 倉根一郎, 尾崎泰子, 佐多徹太郎, 倉田毅, 小島朝人 ワクチニアウイルス LC16m8 株の有効性と遺伝子構造の解析. 第 52 回日本ウイルス学会学術集会, 2004 年 11 月, 横浜
- 西條政幸, 網康至, 永田典代, 須崎百合子, 緒方もも子, 福士秀悦, 水谷哲也, 長谷川秀樹, 岩田奈織子, 佐多徹太郎, 倉根一郎, 倉田毅, 森川茂 LC16m8 株痘そうワクチンによるカニクイザルにおけるサル痘発症予防効果. 第 52 回日本ウイルス学会学術集会, 2004 年 11 月, 横浜
- 福士秀悦, 水谷哲也, 西條政幸, 緒方もも子, 倉根一郎, 森川茂 ACE2 発現細胞を用いた SARS コロナウイルス感染の検討. 第 52 回日本ウイルス学会学術集会, 2004 年 11 月, 横浜
- 水谷哲也, 福士秀悦, 西條政幸, 緒方もも子, 倉根一郎, 森川茂 SARS-CoV 感染細胞におけるアポトーシスに関するシグナル伝達系の網羅的検討. 第 52 回日本ウイルス学会学術集会, 2004 年 11 月, 横浜
- 水谷哲也, 福士秀悦, 村上正晃, 西條政幸, 倉根一郎, 平野俊夫, 森川茂 SARS コロナウイルスの感染に誘導されるシグナル伝達の解析. 第 27 回日本分子生物学会年会. 2004 年 12 月, 神戸
- 福士秀悦, 水谷哲也, 西條政幸, 倉根一郎, Efficient replication of SARS coronavirus on the cells expression mouse ACE2. 第 27 回日本分子生物学会年会. 2004 年 12 月, 神戸
- 安藤忠助, 山城哲, 西園晃 コンビナトリアル・ライブラリー法を用いたヒト抗狂犬病ウイルス中和 Fab 抗体の作成 第 52 回日本ウイルス学会学術集会 2004 年 11 月 横浜
- 安藤忠助, 山城哲, 西園晃 コンビナトリアル・ライブラリー法を用いたヒト抗狂犬病ウイルス中和 Fab 抗体の作成 第 8 回日本ワクチン学会学術集会 2004 年 10 月 札幌
- 井上直樹, T Spira, L Lam, JL Corchero, W Luo. HHV-8 と HIV 重感染者におけるカポジ肉腫発症群と非発症群の間での免疫反応の比較 第 19 回ヘルペスウイルス研究会 2004 年 6 月
- 桑山 勝, 伊藤美佳子, 高尾信一, 島津幸枝, 福田伸治, 宮崎佳都夫, 倉根一郎, 高崎智彦. 小児髄膜炎患者からの日本脳炎ウイルス遺伝子検出. 第 52 回日本ウイルス学会総会 (横浜市) 2004 年 11 月
- 田島 茂, 高崎智彦, 江下優樹, 倉根一郎. 日本で分離された Yokose ウイルスの性状解析. 第 38 回日本脳炎ウイルス生態学研究会 (神戸市) 2004 年 6 月
- 田島 茂, 伊藤美佳子, 高崎智彦, 倉根一郎. デングウイルス 1 型完全長 cDNA クローンの作成およびウイルス産生系の確立. 第 52 回日本ウイルス学会総会 (横浜市) 2004 年 11 月
- 橋本浩一, 細谷光亮, 石橋 啓, 金子久俊, 錫谷達夫. STAT-1 欠損マウスを用いた重症

Respiratory Syncytial Virus 感染症発症
病理の検討 第52回日本ウイルス学会学
術集会 横浜 (2004)

金子久俊、橋本浩一、石橋 啓、青木功喜、
大野重昭、錫谷達夫。 LAMP 法による単純
ヘルペスウイルスの迅速同定 第52回日
本ウイルス学会学術集会 横浜 (2004)

石橋 啓、橋本浩一、金子久俊、錫谷達夫。
ヒトサイトメガロウイルス (HCMV) タイプ
別抗体の測定とその臨床応用。 第52回
日本ウイルス学会学術集会 横浜 (2004)

横田伸一、横沢紀子、岡林環樹、錫谷達夫、
藤井暢弘。 HSV-1 感染による宿主
JAK/STAT ネガティブレギュレーター
SOCS3 の誘導とその意義。 第52回日本
ウイルス学会学術集会 横浜 (2004)

茂田士郎、森修一、山瀬利博、杉井俊二、田
島朋子、錫谷達夫。 コロナウイルス感染症
に対する抗ウイルス剤の開発-ポリオクソ
メタレート抗ウイルス効果-。 第1
4回抗ウイルス化学療法研究会 名古屋
(2004)

錫谷達夫、金子久俊、森修一、橋本浩一。 黒
色果汁の抗ウイルス効果の検討。 第14回
抗ウイルス化学療法研究会 名古屋 (2004)

金子久俊、川名尚、錫谷達夫。 単純ヘルペス
ウイルス1型、2型混合感染症の解析。 第
58回日本細菌学会東北支部総会 仙台
(2004)

錫谷達夫。 ヘルペスウイルスのインターフェ
ロン抵抗性。 第14回抗ウイルス化学療法
研究会、名古屋2004。

錫谷達夫。 感染症予防対策。 福島県国保地域
医療学会。 7月10日 福島市

錫谷達夫。 移植後サイトメガロウイルス感染
症の発症病理。 第10回福島移植フォーラ

ム。 7月17日 福島市

錫谷達夫。 先天性サイトメガロウイルス感染
による聴覚障害。 平成16年度病診連携懇
談会。 11月17日 福島市

H. 知的財産権の出願・登録状況

特願 2004-332680

狂犬病ウイルスを効果的に中和するヒト抗体

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	巻号	ページ	出版年
Pakamatz Khawplod	A novel rapid fluorescent focus inhibition test for rabies virus using a recombinant rabies virus visualizing a green fluorescent protein	Journal of Virological Methods	125	35-40	2005

P 遺伝子欠損狂犬病ウイルスベクターの作製とワクチンとしての有用性の検討

〔主任研究者〕 森本金次郎（国立感染症研究所ウイルス第一部 室長）

〔協力研究者〕 伊藤 睦代（国立感染症研究所ウイルス第一部 研究員）

研究要旨：発現ベクターとしての狂犬病ウイルスベクターの広範な利用を目指して、遺伝子欠損狂犬病ウイルスを作製した。さらに、このような増殖欠損ウイルスのワクチンとして有効性を検討した。まずは P 遺伝子欠損狂犬病ウイルスを作製し、その性状解析を行った。P 蛋白質発現細胞および非発現細胞における def-P ウイルスの増殖動態・遺伝子発現を解析した。def-P ウイルスの病原性を検討するため、乳のみマウス・成熟マウスに脳内接種し、経過を観察した。さらに、def-P ウイルスを各種経路でマウスに接種し、中和抗体の誘導能と致死的なウイルスチャレンジ感染に対する防御効果について検討し、筋肉接種、腹腔接種では十分な防御効果を有することが示された。

A. 研究目的

日本のヒト用狂犬病ワクチン株である狂犬病ウイルス HEP-Flury 株の全長 cDNA をクローニングし、そのプラスミドからのウイルスの作製法を確立した。このリバースジェネティクス法により、ゲノムの改変が容易となり、新規ワクチンの開発やウイルスベクターとしての応用が可能となった。HEP-Flury 株は末梢感染からの病原性の減弱した弱毒株であるが、現在は不活化ワクチンとして使用されている。発現ベクターとしての利用には安全性の面からも何らかの改良を加えなければならない。そこで、我々は遺伝子欠損ウイルスを作製し、そのベクターとしてあるいはワクチンとしての有用性を検討した。狂犬病ウイルスがもつ 5

つの遺伝子の内、まずは P 遺伝子欠損狂犬病ウイルスを作出し、その性状解析を行った。さらに弱毒生ワクチンとしての有用性を検討するため、マウスに対する病原性とワクチンとしての防御免疫誘導能について調べた。

B. 研究方法

1) P 遺伝子欠損ウイルスの回収

P 遺伝子欠損ウイルスの効率的な回収および増幅のため、まず、P 蛋白質をトランスに供給する神経芽腫細胞 NA 細胞、BHK-21 細胞を作製樹立した (NA-P 細胞、BHK-P 細胞と呼ぶ)。この細胞に P 遺伝子領域を欠失させた HEP-Flury 株ゲノム cDNA プラスミドをヘルパー・プラスミド (N, P, L, G) と共にトランスフェクトし、

P遺伝子欠損HEP-Fluryウイルス (def-P と呼ぶ) を回収した。回収したウイルスをP蛋白質発現細胞で増幅させウイルス・ストックとした。

2) ウイルス病原性の解析

ICR 乳のみマウスにウイルス液 20 μ l を脳内接種し、感染後 2 週間経過を観察した。6 週齢 ICR マウスにウイルス液 30 μ l を脳内接種し、体重変化と臨床症状を観察した。

3) マウスへの免疫と防御試験

ワクチンによる防御効果は図 2 に示した投与経路、投与スケジュールで行った。6 週齢の ICR マウスにワクチンとして def-P ウイルス液を投与した (腹腔、筋肉内、鼻腔、口腔)。チャレンジ感染として、50LD₅₀ に相当する CVS 株を脳内 (30 μ l) あるいは筋肉内 (100 μ l) 接種した。臨床症状の経過を 2-3 週間観察し、生存率を計算した。

4) ウイルス中和抗体価の測定

免疫マウスの眼窩静脈叢から血液を採取し、血清中の中和抗体価を測定した。10 倍希釈した各血清を引き続き 4 倍階段希釈し、RFFIT (rapid fluorescent focus inhibition test) 法によって、中和抗体価を測定した。攻撃ウイルス (HEP-Flury 株) の感染を 50% 中和する最も高い希釈倍率の逆数を中和抗体価とし、WHO の抗狂犬病標準抗体を用いて、国際単位 (IU) に換算した。

C. 研究結果

1) P 遺伝子欠損ウイルスの性状解析

欠損した P 蛋白質を補うため、マウス神経芽腫細胞 (NA)、ハムスター BHK-21 細胞を用いて、P 遺伝子発現プラスミドをトランスフェクトし、P 蛋白質発現細胞 (NA-P, BHK-P) を樹立した。ウイルス完全長 cDNA プラスミドから P 遺伝子のコード領域を取り除いたプラスミド (p-HEP-delP) を作製し、P 蛋白質発現細胞 (NA-P, BHK-P) において、P 遺伝子欠損狂犬病ウイルス粒子 (def-P virus) を産生することに成功した (図 1)。この def-P virus は NA-P, BHK-P 細胞でのみ増殖可能で、子孫ウイルスを産生することが示された。この def-P virus の *in vitro* での性状解析を行ない、増殖速度、転写産物の解析、ウイルス蛋白質の産生等を調べた結果、ウイルスの増殖、ウイルスタンパクの産生量は P 蛋白質発現細胞 (NA-P, BHK-P) 中で発現している P 蛋白質の量に依存していることが明らかとなった。通常の狂犬病ウイルス感染細胞のおよそ 5% の量を産生していることが分った (表 1)。

一方、通常の P 蛋白質非発現細胞では培養上清中にはほとんど子孫ウイルスは放出されないが、ウイルス蛋白質の発現は僅かではあるが確実に検出された。def-P ウイルスは通常の細胞に感染し、ウイルス蛋白質は発現されるが、子孫ウイルス粒子の産生はみられないことが分った。

2) 病原性

HEP-Flury 株は最も弱毒化した狂犬