

病ウイルス株の1つであり、成熟マウスでは脳内接種でも死なず、乳のみマウスに対してのみ致死性である。def-P ウイルスは乳のみマウスの脳内接種でもマウスを殺すことなく、成マウスの脳内接種においても体重減少を示さず、完全に病原性を欠失していることが示された。

### 3) P 遺伝子欠損ウイルス接種後のウイルス中和抗体誘導と感染防御効果

def-P ウイルスは完全に非病原性であるが、感染細胞内ではP蛋白質の供給がなくともウイルス蛋白質の発現が確実に起こっている。そこで、def-P ウイルスのワクチン（いわゆる半生ワクチン）としての効果を調べた。まずは狂犬病ワクチン評価の標準法であるNIHテストと同じ投与経路スケジュールによって検討した（図2A）。def-P ウイルスとその親ウイルスであるrHEP ウイルスを腹腔内接種 $10^6$ FFUで免疫し、致死量の攻撃ウイルスに対しての生存率を示している。def-P ウイルス接種群は致死量のCVS ウイルスチャレンジに対して十分な防御効果を示した。ウイルス中和抗体(VNA)は狂犬病からの防御において、主要な役割を担っていることから、上記実験免疫マウスの中和抗体価を測定した。その結果VNA 価はウイルス摂取濃度依存的に誘導されることが示された。 $10^6$ FFUの接種では、中和抗体平均力価がdef-P ウイルス免疫群で5.6 IU、rHEP ウイルス接種群で2.5 IUであり、def-P ウイルスがrHEP ウイルスより高い中和抗体を誘導することが分かった。これらのデータから、def-P ウイルスは $10^6$ FFUのウイルス量で、感染

防御に十分なVNAと防御免疫を誘導することが示された。

さらに、各種経路から免疫後の致死量ウイルス感染に対する防御効果を調べた結果、筋肉2回接種においては十分な防御効果を示した（図2B）。筋肉1回接種においても末梢感染チャレンジでは防御効果を示した。しかしながら、脳内チャレンジでは防御効果は示されなかった

（図2C）。鼻腔接種では2回接種において若干の防御効果が見られたが、不十分であった（図2D）。鼻腔接種、口腔接種1回では防御効果は得られないことが分かった（図2E）。

### [D. 考察]

P 遺伝子欠損ウイルス (def-P 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、増幅させることができた。def-P ウイルスはP蛋白質発現細胞内で、親ウイルスに比べてやや増殖速度が遅いものの子孫ウイルスを産生することを確認した。一方、P蛋白質非発現細胞では子孫ウイルスの産生は見られなかったが、P蛋白質のトランスな供給がなくとも、ビリオン中に含まれるP蛋白質を利用して初期の転写・翻訳が行われることが示された。ウイルスゲノムRNAの複製はないものと予想され、実際、感染性子孫ウイルスの放出はほとんど見られなかった。

def-P ウイルスの増殖速度は遅いが、これはおそらくP蛋白質の供給が不十分であるためと考えられる。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れば、より高い産生量が期待される。P蛋白質

誘導発現系の細胞を新たに構築することにより、ウイルス産生量の増加を検討している。

def-P ウイルスはマウスに対して完全に非病原性であった。いかなる動物においても接種による病原性の発現はないものと予想され、また、遺伝子突然変異による病原性の復帰も完全に否定される。

我々は接種経路による def-P ワクチン接種の有効性をみるため、様々な接種経路による中和抗体価産生と防御効果を調べる実験を行った。野生動物に対するワクチン対策として、経口投与が理想であることから、経口投与試験も行ったが今回の条件では十分な防御効果は得られなかった。筋肉接種、腹腔接種では十分なワクチンとしての有効性が示された。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。

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において、M 遺伝子欠損ウイルスの生成を現在進行中である。

#### [E. 結論]

P 遺伝子欠損ウイルス def-P ウイルスは、マウスにおいて病原性を発揮せず、また、マウスに対する腹腔内・筋肉内接種で十分な中和抗体を誘導し、致死的な狂犬病ウイルス感染に対して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候補と発現ベクターとなりえ

ることが示された。

#### [F. 研究発表]

##### 1. 論文発表

- 1) 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).
- 2) 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).
- 3) 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)
- 4) Hemachudha, T., Wacharapluesadee, S., Mitrabhakdi, E., Wilde, H., Morimoto, K., Lewis, R. A. Pathophysiology of human paralytic rabies. *Journal of Neurovirology*, 11, 93-100 (2005).
- 5) Morimoto, K., Shoji, Y., Inoue, S. Characterization of P gene-deficient rabies virus. The propagation, pathogenicity and immunogenicity. *Virus Research*, in press

(2005).

6) 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).

7) 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).

8) 森本金次郎、伊藤（高山）睦代：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）

## 2. 学会発表

1) 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)

2) 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)

3) 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)

4) 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）

5) 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）

図 1. P遺伝子欠損ウイルス作製の模式図

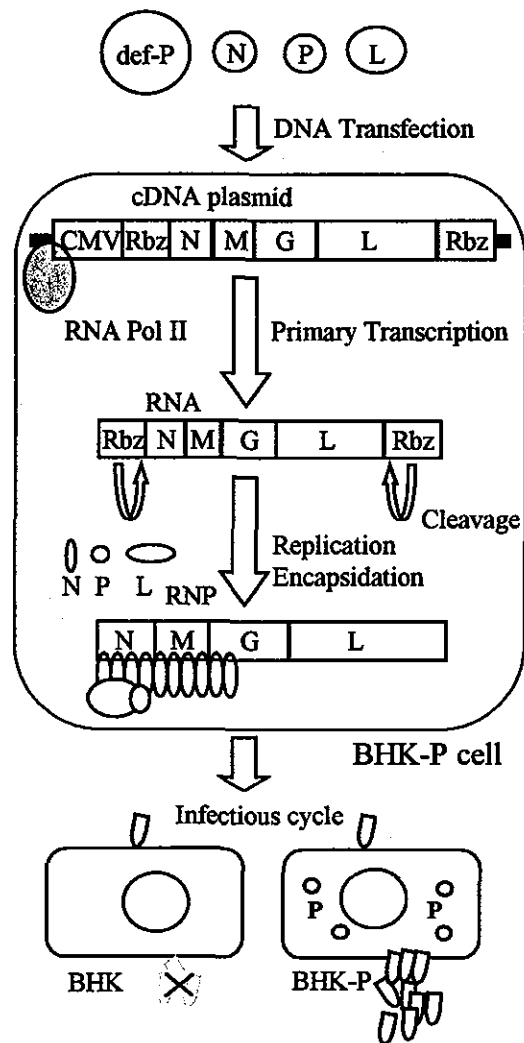
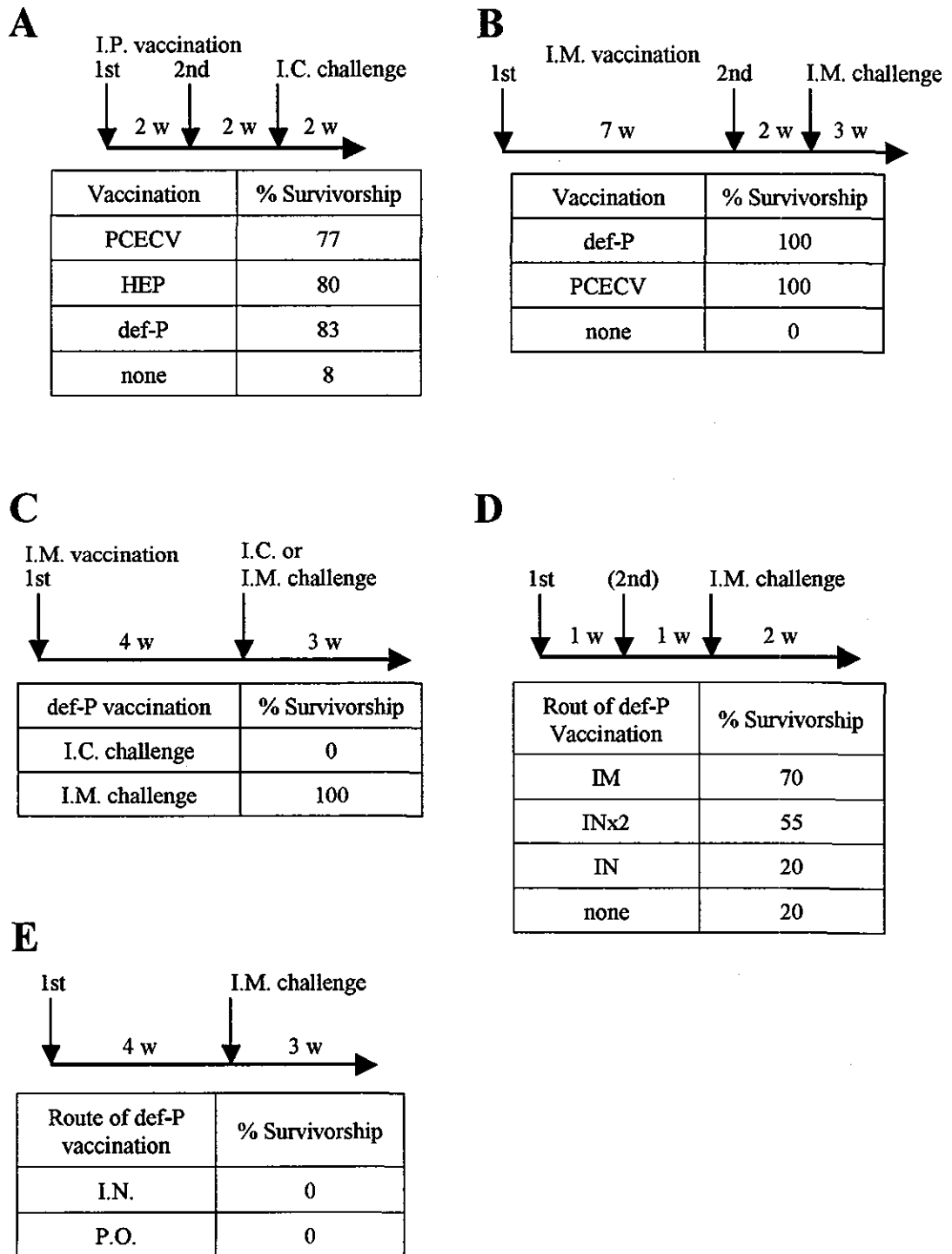


表 1 . HEP感染とdef-P感染の量的比較

	HEP infection	def-P infection
Transcription	100%	8%
N expression	100%	4%
Virus titer	100% ( $10^9$ FFU/ml)	5% ( $5 \times 10^7$ FFU/ml )
P-expression in cells	100%	7%

図2. 各種投与経路とスケジュールにおける防御効果



## 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

- [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）  
[分担研究者] 西園 晃（大分大学医学部微生物学教室）  
[共同研究者] Pakamat Khawplod（タイ国赤十字 Queen Saovabha Memorial  
Institute）

研究要旨：GFP-組換え狂犬病ウイルスを中和抗体測定に用いることにより、蛍光標識抗体を用いる必要のない中和抗体測定法を開発した（GFP法）。タイ国赤十字 Queen Saovabha Memorial Instituteにおいて保管されているヒト血清 25 サンプル、イヌ血清 18 サンプル、ウマ血清 15 サンプルにおいて、従来の方法（タイ赤十字における中和抗体測定の標準法）と GFP 法により得られたウイルス中和抗体価の値を測定、統計処理により信頼性を比較検討し、両法により得られた抗体価には強い相関関係があることが示された。高価な蛍光標識抗体を用いない簡便な方法として利用可能である。

### A. 研究目的

我々は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 cDNA 発現法（リバーシジェネティクス）を利用することにより、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。この手法により作製した GFP-組換え狂犬病ウイルスを中和抗体測定に用いることにより、新たな測定法を開発した。

狂犬病ワクチンの有効性の検討には中和抗体価の測定が必要不可欠である。現在最も信頼されている方法として rapid

### fluorescent focus inhibition test

(RFFIT)が広く用いられている。この方法は一定量のウイルスと血清を混ぜ、感染細胞の減少を測定することにより、その血清の抗体価を算出する方法である。多くの研究室では市販されている

FITC-anti rabies antibody を使用して、感染細胞を蛍光標識し、蛍光顕微鏡により観察して、抗体価を算出している。市販の FITC-anti rabies antibody は高価であることから、GFP を発現する組換え狂犬病ウイルスを用いることで、FITC 標識抗体を使用することなく、中和抗体価を測定する方法を開発し、従来の方法との比較を行った。

## B. 研究方法

### 1) GFP 遺伝子組換え狂犬病ウイルスの回収

HEP-Flury 株ゲノム cDNA プラスミドの G 遺伝子と L 遺伝子の間に GFP 遺伝子を制限酵素 BsiWI と PstI を利用して挿入し、GFP 遺伝子組換え狂犬病ウイルス・プラスミドを作製した (p3.0-GFP)。そのプラスミドをヘルパー・プラスミド (N, P, L, G) と共に BHK-21 細胞にトランスフェクトし、GFP 遺伝子組換え狂犬病ウイルスを回収した。BHK-21 細胞は 10%FBS 添加 D-MEM で、6well プレートに 80%コンフルエントになるよう一晩培養した。トランスフェクションする前に培養液を新鮮なものに取り換え、P3.0-GFP 2.0  $\mu$ g, pH-N 0.5  $\mu$ g, pH-P 0.25  $\mu$ g, pH-L 0.1  $\mu$ g, pH-G 0.15  $\mu$ g を TransIT LT-1 を用いてトランスフェクションした。16 時間後に細胞を洗い、10% FBS 加 D-MEM で 5 日間培養した。培養液を新たな BHK-21 細胞に加え、34°C で 3 日間培養した。その培養上清を回収し、その後の実験に用いるウイルス・ストックとして力価測定し、保存した。このウイルスを rHEP-GFP と呼ぶ。

### 2) 免疫蛍光染色とウイルス力価測定

GFP 遺伝子組換え狂犬病ウイルス rHEP-GFP は、FITC-抗狂犬病 N 蛋白質抗体を用いた免疫蛍光法及び蛍光標識抗体を使用せずに blue excitation filter 蛍光顕微鏡下で観察可能となった。ウイルス液を 10 倍階段希釈で単層培養、96well の BHK-21 細胞に添加し 34°C で感作させ

た。48 時間後に 80%アセトンで細胞を固定し、FITC-抗狂犬病 N 蛋白質抗体で染色した。蛍光顕微鏡下でフォーカスを数え、FFU/ml を算出した。

### 4) ウイルス中和抗体価の測定

タイ国赤十字 Queen Saovabha Memorial Institute において保管されている 25 のヒト血清、18 のイヌ血清、15 のウマ血清において、従来の方法 (タイ赤十字における中和抗体測定の標準法) と GFP 法により得られたウイルス中和抗体価の値を測定、統計処理により信頼性を比較検討した。攻撃ウイルス (HEP-Flury 株) 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. GFP 遺伝子組換え狂犬病ウイルス (rHEP-GFP) の性状解析

rHEP-GFP ウイルスとその親株である cDNA より得られた rHEP 株、オリジナルの HEP-Flury 株の増殖をマウス NA 細胞で調べた (図 1 A)。3 株においてその増殖には大きな違いが見られなかった。外来 GFP 遺伝子を挿入したことによる、増殖の遅れなどは観察されなかった。感染した細胞内でウイルス蛋白質の発現に加えて、GFP が発現していることが観察された (図 1 B)。

### 2. 中和抗体価の測定

同一の血清を用いて 3 つの方法において測定した



(1) タイ赤十字において従来より行われている RFFIT 法 [RFFIT 法]: チャレンジウイルスとして CVS 株を用い、FITC 標識抗体を用いて、蛍光 positive 細胞を観察する。(2) [FITC 法]: チャレンジウイルスとして rHEP-GFP 株を用い、FITC 標識抗体を用いて、蛍光 positive 細胞を観察する。(3) [GFP 法]: チャレンジウイルスとして rHEP-GFP 株を用い、GFP の発現による蛍光 positive 細胞を観察する。以上の 3 法により各々の血清の中和抗体価を測定した。ヒト血清により得た値を図 2 に示す。3 つの測定法において大きな値の違いは見られなかった。

まずは、[FITC 法]と[GFP 法]の値を比較することで、蛍光測定の違いによる値の相関関係を調べた(チャレンジウイルスとして rHEP-GFP 株を用いている)。ヒト血清、ウマ血清とも両法の値に強い相関関係が示された。(図 3 A、B)

さらに、ヒト血清とウマ血清において [RFFIT 法]と[GFP 法]の値を比較した。ヒトとウマの血清は Chiron 社の RCEC ワクチンを接種されている。RCEC ワクチン LEP-Flury 株を種ウイルスとしており、これは HEP-Flury 株と近縁の株である。又、イヌ血清は Rhone Merieux 社の Rabisin ワクチンを接種されている。このワクチンは Pitman-Moore 株より製造されており、この株は CVS 株と近縁である。従って、ヒトとウマ血清を [RFFIT 法]と [GFP 法]で測定する場合、[GFP 法]は近縁の HEP-Flury 株をチャレンジウイルスとして使用しており homologous challenge、[RFFIT 法]は heterologous

challenge となる。逆にイヌ血清を測定する場合、[RFFIT 法]は近縁の CVS 株をチャレンジウイルスとして使用しており homologous challenge、[GFP 法]は heterologous challenge となる。ヒト血清とウマ血清を [RFFIT 法]と [GFP 法]で測定した値の相関関係を図 3 C、イヌ血清を [RFFIT 法]と [GFP 法]で測定した値の相関関係を図 3 D、に示す。どちらも強い相関関係を示した。homologous challenge の方が若干高い中和抗体価を示すことも分った。

#### D. 考察

ヒト、ウマ、イヌの血清を用いて、3 種類の方法において、中和抗体価の測定を行った。3 種類の測定法において、強い相関関係が示された。GFP 遺伝子組換え狂犬病ウイルスを用いた新たな中和抗体測定法として利用可能である。

WHO は狂犬病ウイルスに対する中和抗体の値として、その防御には 0.5 IU 必要としている。[RFFIT 法]と[GFP 法]を比べて、両者は強い相関関係があるが、低い値を示した時に注意が必要であることが分った。接種されたワクチンの株により、[RFFIT 法][GFP 法]とも接種したワクチンと近縁の株をチャレンジウイルスとして用いた場合若干高い値を示すことがわかった。0.5 IU 付近の値を示した血清においては、接種したワクチンの株が何であるかを考慮して判断をくださなければならない。

#### E. 結論

GFP 遺伝子組換え狂犬病ウイルス

rHEP-GFP を用いた中和抗体測定法 (GFP 法) は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。

[F. 研究発表]

1. 論文発表

1) 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).

2) 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).

3) 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)

4) Hemachudha, T., Wacharapluesadee, S., Mitrabhakdi, E., Wilde, H., Morimoto, K., Lewis, R. A. Pathophysiology of human paralytic rabies. *Journal of Neurovirology*, 11, 93-100 (2005).

5) Morimoto, K., Shoji, Y., Inoue, S.

Characterization of P gene-deficient rabies virus. The propagation, pathogenicity and immunogenicity. *Virus Research*, in press (2005).

6) 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).

7) 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).

8) 森本金次郎、伊藤 (高山) 睦代: 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)

2. 学会発表

1) 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)

2) 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)

3) 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)

4) 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)

5) 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21-2  
3日 (横浜)

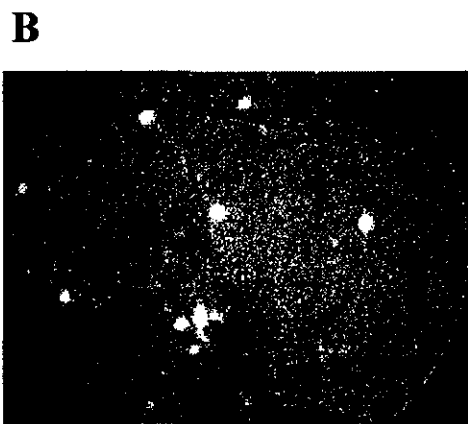
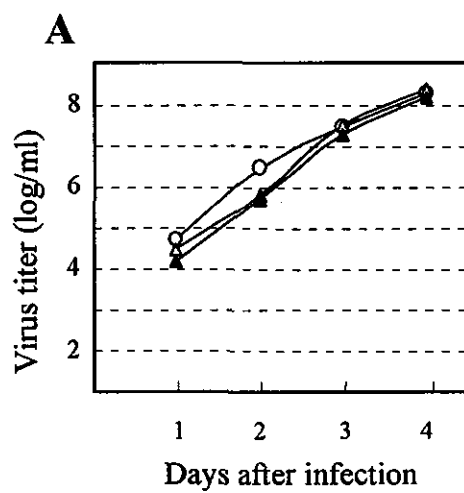


図1. (A) rHEP-GFPウイルスの増殖曲線  
wHEP (○)、rHEP (△)、rHEP-GFP (▲)。  
(B) 蛍光顕微鏡で観察されるウイルス感染細胞  
のGFP蛍光のフォーカス像 (白点)。

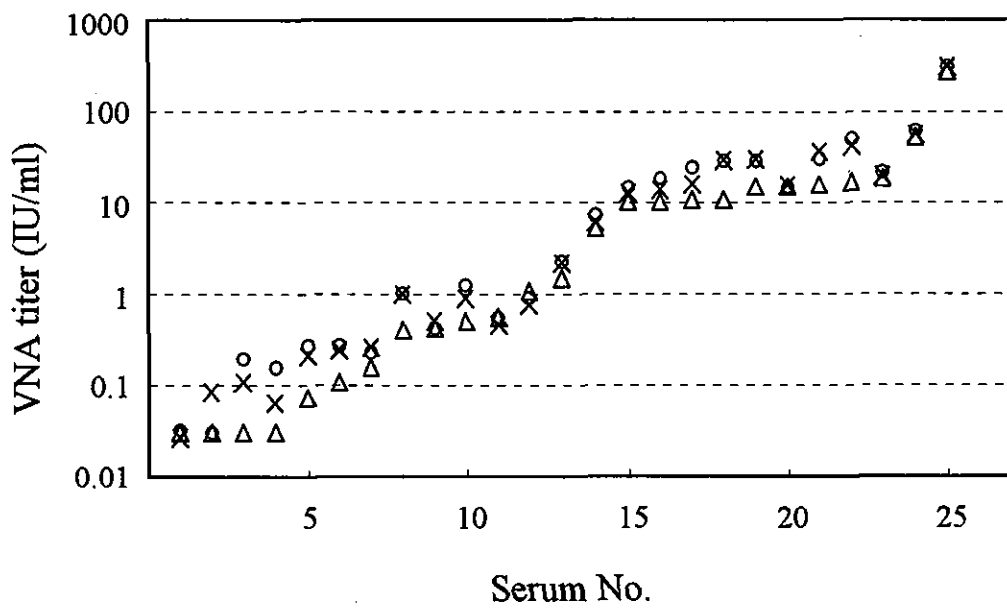


図2. 3法により測定したヒト血清の中和抗体価  
 rHEP-GFPを用いたFITC-法 X, RFFIT-GFP O, standard RFFIT Δ

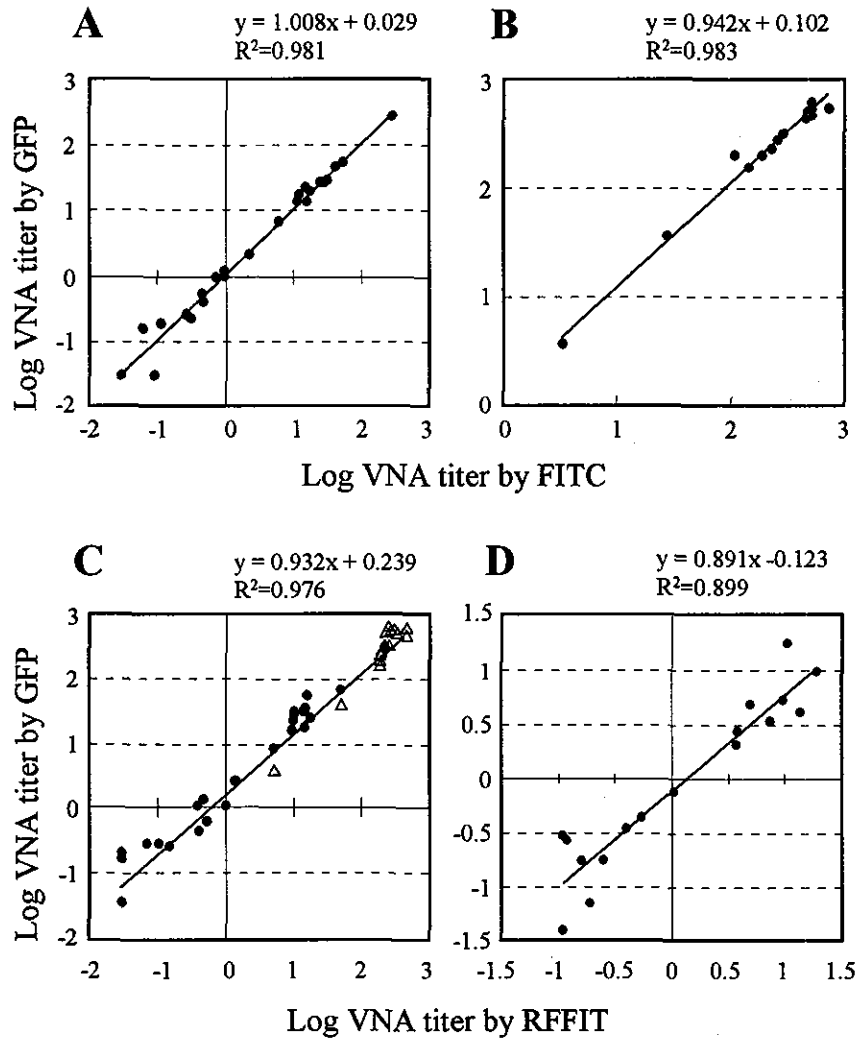


図3. ヒト血清(A)とウマ血清(B)での FITC-法とRFFIT-GFP法  
のより得た中和抗体価測定値の相関関係。  
ヒト血清とウマ血清での RFFIT法とRFFIT-GFPの相関関係(C)。  
イヌ血清でのRFFIT法とRFFIT-GFPの相関関係(D)。

## 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

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)

協力研究者 中道一生(国立感染症研究所ウイルス第一部第三室研究員)

倉根一郎(国立感染症研究所ウイルス第一部部長)

研究要旨:弱毒化狂犬病ウイルス(RV)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。末梢部位に接種されたRV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ため、本研究ではRVに対するマクロファージの応答機序を調べた。マクロファージ由来RAW264細胞はRV感染に対して非感受性を示し、子孫ウイルスの産生は観察されなかった。RVを接種したRAW264細胞を用いて免疫応答遺伝子の発現プロファイリングを行った結果、RVはTh1細胞等をターゲットとするCXCケモカインリガンド(CXCL10)の産生を選択的に誘導する一方、他種のケモカインや炎症性及び抗ウイルス性サイトカインの発現には影響を及ぼさないことが分かった。また、RVはExtracellular signal-regulated kinase (ERK)1/2シグナル経路を介してCXCL10の発現を誘導することが示唆された。さらにRVに対するマクロファージのERK1/2シグナリングは、ウイルス粒子がエンドソーム/リソソームにおいて処理される過程において生じることを明らかにした。

### A. 研究目的

狂犬病ウイルス(RV)はラブドウイルス科リッサウイルス属に分類される一本鎖RNAウイルスである。街上毒株に代表されるRV株の多くは高い神経向性を示し、温血動物において致死的病態を引き起こす。これに対して、培養細胞において高度継代されたワクチン株では神経病原性が減衰するだけでなく、接種動物において液性、細胞性双方の免疫応答を強力に誘導することが知られている。近年では、リバーズジェネティクスによるゲノム改変技術を基盤として、弱毒化RVを免疫誘導活性の乏しい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おり、その免疫増強効果が実験レ

ベルにおいて実証されている。

RVによる免疫賦活にはウイルス膜糖蛋白質(G)、及びヌクレオカプシド構成蛋白質(N)が関与することが報告されている。しかしながら、RVに対する免疫担当細胞の応答様式、並びに活性化機序の詳細は未だ明らかとなっていない。これまで、実験動物モデルを用いた研究によって、末梢局所に接種されたRV粒子の多くはマクロファージ系細胞内に存在することが明らかとなっており、マクロファージによるRV粒子の取り込みや消化過程において何らかの細胞活性化メカニズムが起動していることが推察できる。本研究では、マクロファージへのRV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。

## B. 研究方法

### 1) 細胞とウイルス:

マウスマクロファージ系細胞株RAW264、及びマウス神経芽種由来細胞株NAを用いた。

### 2) ウイルス:

RV固定毒株 challenge virus standard-11(以降、CVSと略す)、及び弱毒RVワクチン株 high egg passage-Flury(以降、HEPと略す)を用いた。ウイルスストックの調製及び力価測定にはNA細胞を用いた。また、シヨ糖密度勾配によるウイルス粒子精製は常法に従った。

### 3) マクロファージへのRV感染:

RAW264細胞にRVを多重感染度(MOI)10にて接種した後、経時的に細胞を固定し、FITC標識抗RV-N抗体を用いて蛍光染色した。また、培養上清中への子孫ウイルスの放出をフォーカス形成試験により測定した。

### 4) 宿主遺伝子発現パターンの解析:

RAW264細胞にRVを接種した後、経時的に細胞を回収し、全RNAを抽出した。常法に従って相補DNA(cDNA)を合成した後、インターフェロン(IFN)- $\alpha$ 、及びIFN- $\beta$ 、IFN- $\gamma$ 、腫瘍壊死因子(TNF)- $\alpha$ 、インターロイキン(IL)-1 $\beta$ 、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)- $\beta$ 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を標的として半定量PCRを行った。

### 5) ケモカインCXCL10蛋白質の定量:

細胞にRVを接種した後、経時的に培養上清を回収し、CXCL10蛋白質量をQuantikine mouse IP-10 immunoassay kit (R&D Systems社)を用いたELISA法によ

り測定した。

### 6) Mitogen-activated protein kinase (MAPK) リン酸化の定量:

RVを接種した細胞を経時的に回収し、界面活性剤(Triton X-100)、及び蛋白質分解酵素阻害剤、脱リン酸化酵素阻害剤を含む緩衝液に浮遊させた後、超音波破碎処理を行った。得られた蛋白質溶液を抗リン酸化MAPK抗体によるウェスタンブロット解析に供した。

### 7) 液胞内pHの中和試験:

細胞を液胞プロトンポンプ阻害剤(bafilomycin A1)及び弱塩基(ammonium chloride)にて2時間前処理した後、RVを接種し、CXCL10蛋白質産生及びMAPKリン酸化を上記と同様の手順により解析した。

### 8) MAPK活性化阻害試験:

RAW264細胞をMAPK / extracellular signal-regulated kinase (ERK) kinase (MEK)阻害剤(U0126及びPD98059)及びp38阻害剤(SB202190)にて1時間前処理した後、RVを接種し、ケモカイン遺伝子発現とMAPKリン酸化を上記と同様の手順により解析した。

## C. 研究結果

### 1) マクロファージへのRVの感染様式:

RVを接種したRAW264細胞では、ウイルス蛋白質の発現はほとんど見られず、また培養上清中への子孫ウイルスの産生も観察されなかった。この結果から、RAW264マクロファージはRV感染に対して非感受性を示すことが分かった。

### 2) RVに対するマクロファージの遺伝子発現応答:

RVを接種したRAW264細胞(接種24時間後)では、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、IFN- $\alpha$ 、及びIFN- $\beta$ 、IL-18遺伝子の発現レベルが約3



～5倍増加した。RVに対するRAW264のケモカイン遺伝子発現応答では、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。これに対して、他のケモカイン(CXCL2、CXCL11、CCL2、CCL3、CCL5)遺伝子の発現レベルは対照群と比較して2～7倍程度であった。また、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。以上の結果から、RVはマクロファージのケモカインCXCL10の遺伝子発現を選択的かつ飛躍的に増大することが分かった。

### 3) RV粒子に対するマクロファージのMAPKシグナル活性化:

上記の結果から、RV粒子はマクロファージのCXCL10遺伝子発現に至る何らかの細胞内シグナル伝達経路を活性化することが考えられる。本研究では、マクロファージの活性化において重要な役割を担うMAPK分子であるERK1/2及びp38を、RV刺激による活性化を調べた。RVを接種したRAW264細胞では、接種後12時間以降においてリン酸化ERK1/2が検出された。これに対して、p38のリン酸化レベルには変化が見られなかった。また、UV照射によって不活化したRV粒子を添加した場合においても同様のERK1/2のリン酸化が観察された。このことからRV粒子はマクロファージのERK1/2シグナル経路を刺激することが分かった。

### 4) RVに対するマクロファージ応答における液胞酸性化の意義

過去の研究によって、マクロファージはRV粒子をエンドサイトーシスによって細胞内に取り込み消化することが明らかとなっている。この過程がRVによるERK1/2シ

グナル活性化並びにCXCL10の発現誘導と関係があるか否かを調べた。RAW264細胞をbafilomycin A1もしくはammonium chlorideにて前処理した場合、RVによるERK1/2のリン酸化及びCXCL10の発現誘導は対照群と比較して顕著に低下した。このことから、RVによるマクロファージ活性化は、エンドソーム/リソソームを介したウイルス粒子の処理過程において誘導されることが分かった。

### 5) RV誘導性CXCL10遺伝子発現におけるERK1/2シグナル経路の役割:

RV粒子によるマクロファージのCXCL10遺伝子発現誘導においてERK1/2シグナル経路が関与するか否かを調べた。ERK1/2の上流キナーゼMEKに対する阻害剤にて処理したRAW264細胞にRV粒子を添加した場合、CXCL10の遺伝子発現及び蛋白質産生は顕著に低下した。これに対してp38阻害剤にて細胞を処理した場合ではこのような抑制効果は観察されなかった。以上のことから、RV粒子はマクロファージのERK1/2経路を介してCXCL10遺伝子の発現を選択的に増強することが分かった。

## D. 考察

ワクチン開発における弱毒化RVベクターの有用性として、①狂犬病ワクチンは世界的規模で使用されており、他の病原体抗原を有する多価ワクチンとして応用することでワクチン生産や貯蔵、接種時のコストを大幅に削減できる点、②多価ワクチンを生産する際には現行の狂犬病ワクチン製造ラインを用いることができるため、新たな設備投資を必要としない点、③ゲノム構成が単純であるため組換えウイルスの作出が容易である点、等が挙げられる。しかしながら、RVベクターを用いた抗原デリバリーシステムの最大の魅力は優れた免疫増強効果にある。最近の研究から、ヒト免疫

不全ウイルスやC型肝炎ウイルスの構造蛋白質遺伝子を組み込んだ弱毒RVベクターが、接種動物において特異免疫を飛躍的に増大することが報告されている。加えて、この免疫増強効果は、外来蛋白質を発現させた不活化ウイルス粒子においても生じることが明らかとなっている。このことは、不活化RV粒子自体がワクチンアジュバントとして機能しうることを意味する。不活化RV粒子を免疫誘導能の乏しい異種病原体抗原の担体として用いる場合、RVベクター使用における安全性の問題は完全に解決される。

本研究では、RVによる免疫活性化機序を細胞レベルで解析することを目的とし、RV粒子に対するマクロファージ応答、とりわけMAPKシグナル経路の活性化による免疫応答遺伝子の発現誘導を調べた。本研究結果の概略を図1に示す。RVを接種したRAW264マクロファージでは、ウイルス蛋白質の発現が顕著に低下し、子孫ウイルスの産生は観察されなかった。このことから、マクロファージはRV感染に対して非許容性細胞であることが分かった。また、RVを接種したRAW264では細胞増殖や分化に関与するERK1/2カスケードが活性化する一方で、ストレス応答性MAPKであるp38経路には変化がないことが示された。ウイルス感染や増殖がマクロファージ系細胞のMAPKシグナルを活性化することはすでに数例の報告がなされている。しかしながら、RVによるERK1/2シグナル経路の活性化は不活化処理を施したウイルス粒子によっても誘導されることから、ウイルス感染及び複製過程は関与しないものと思われる。また、このERK1/2リン酸化が液胞内の酸性pHを中和することで顕著に阻害されたことから、RVによるERK1/2シグナルカスケードの活性化はウイルス粒子をエンドソームやリソソームにおいて処理する過程で誘導されるものと考えられる。これまでの研究から、液胞内の酸性環境はマクロファージがバクテリア由来CpG-DNAや真菌(*Candida albicans*)、アポト

ーシス細胞等を飲食もしくは貪食した後、ERK1/2経路を活性化する上で必須であることが知られている。本研究では、ウイルスに対するマクロファージのERK1/2活性化においても液胞経路が関与するという初の知見を得た。

マクロファージにおけるサイトカイン及びケモカイン遺伝子発現プロファイリングの結果、RV粒子はケモカインCXCL10の発現を選択的かつ飛躍的に増大することが分かった。CXCL10はマクロファージ系細胞や血管内皮細胞、線維芽細胞等によって分泌されるケモカインであり、レセプターCXCR3を介してT細胞や単球、NK細胞の走化性及び活性化を支配する。CXCR3はTh1細胞の代表的マーカー分子であり、CXCL10は多様な外来性抗原との反応を介在することでTh1反応を促進することが知られている。したがって、RVによるCXCL10の発現誘導が、マクロファージ系細胞を基幹とする免疫賦活機構において重要な役割を担っている可能性が考えられる。加えて本研究では、RV粒子によるCXCL10発現誘導が、ERK1/2阻害剤によって顕著に低下することを示した。これまでに、ERK1/2を介したCXCL10の発現誘導は、上皮細胞へのアデノウイルス侵入において報告されており、本研究結果は同様のメカニズムが免疫担当細胞においても機能していることを示唆する。CXCL10の発現誘導には転写因子IRF3やSTAT、及びNF- $\kappa$ B等が関与する。しかしながら、これらのシグナリングだけでは他の遺伝子発現がほとんど変化しないという事象を完全には説明することができない。したがって、RV粒子によるCXCL10発現誘導機序の詳細を明らかにするためには、ERK1/2活性化によってリン酸化される転写因子を同定する必要があるものと思われる。

RV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。この現

象は、マクロファージがRV感染に対して非感受性であり、ウイルス由来のRNAや蛋白質の産生による遺伝子発現が誘導されないことに起因すると思われる。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RV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。

#### E. 結論

RVに対するマクロファージ応答機序を解析し、細胞内のエンドソーム/リソソーム経路におけるウイルス粒子のプロセッシングがERK1/2シグナルカスケードを活性化させ、CXCL10の発現を選択的に増大することが分かった。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

Nakamichi K, Inoue S, Takasaki T, Morimoto K, and Kurane I. (2004) 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(17):9376-88.

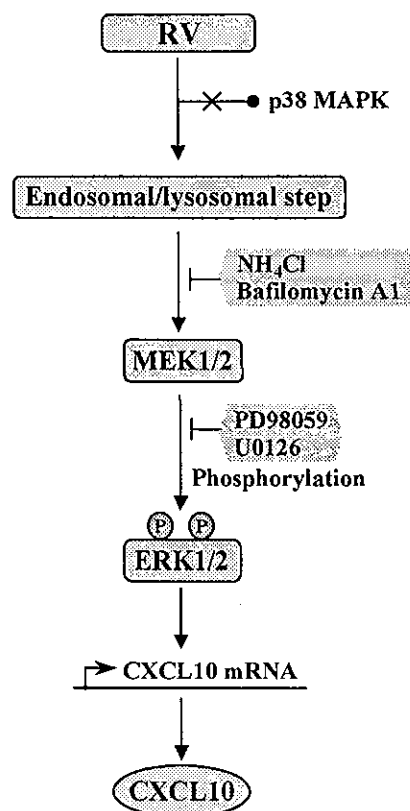
##### 2. 学会発表

中道一生・齊木めぐみ・森本金次郎・倉根一郎. 狂犬病ウイルス感染によるマイクログリアの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学術集会・総会. 2004年11月(横浜).

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

図1. RVに対するマクロファージのERK1/2活性化とケモカイン遺伝子発現応答



分担研究報告書

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

分担研究者 高崎智彦（国立感染症研究所ウイルス第一部第二室室長）

協力研究者 林 昌宏（国立感染症研究所ウイルス第一部第二室研究官）

研究要旨

日本脳炎ウイルスはフラビウイルス科フラビウイルス属のウイルスで日本脳炎ウイルス血清型群に属し、ウエストナイルウイルス、クンジンウイルスなどとその抗原性が極めて類似している。ところでヒトに対する病原性のない狂犬病ウイルスのワクチン株である Flury 株の cDNA に外来遺伝子を導入したウイルスベクターを用いることによって標的の培養細胞あるいは動物個体に外来蛋白質を発現させることが出来る。我々は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されている日本脳炎ウイルスを抗原として選択した。本研究の目的は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を作製するために日本脳炎ウイルスの RNA を抽出し、目的の日本脳炎ウイルス遺伝子を増幅することである。その結果われわれは  $2.4 \times 10^9$  PFU/ml の日本脳炎ウイルスから RNA を抽出し、RT-PCR にて目的遺伝子である C 蛋白質、C 蛋白質から E 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 蛋白質の各領域を増幅した。

A. 研究目的

日本脳炎はフラビウイルス科フラビウイルス属の日本脳炎ウイルスによって発症する急性熱性脳炎である。日本脳炎ウイルスはエンベロープを有する直径 40-50nm の一本鎖 RNA ウイルスで、イエカ属の蚊によって媒介される。日本脳炎ウイルスは東アジアから東南アジア、南アジア地域に広く分布している。感染者の多くが無症状に終わるが本症を発症した場合突然の高熱に始まり重症例では脳神経麻痺などの神経症状を示す。死亡率は 20-40% で特に幼少児や高齢者で高く予後不良である。日本では現在も日本脳炎ウイルスの感染環がブタと蚊の間で維持されておりヒトへの感染の危険性は依然として存在するため今後も日本脳炎に対する予防等の対策が必要である。

日本脳炎ウイルスのゲノムには 5' 側より構造蛋白質のコア蛋白質 (C)、先駆膜蛋白質 (prM)、外被膜蛋白質 (E)、次いで非構造蛋白質 (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5) の遺伝子が順にコードされている。このうち中和抗体誘導に関わる蛋白質は 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質は NS3 及び E である。ところで狂犬病ウイルスのワクチン株である Flury 株の cDNA に外来遺伝子を導入することにより目的の細胞に外来蛋白質を発現させることが可能である。狂犬病ウイルスはラブドウイルス科リッサウイルス属の一本鎖マイナス RNA ウイルスである。狂犬病ウイルス Flury 株は培養細胞レベルで広い宿主域と高い増殖能をもちヒトへの病原性は無い。また免疫抗