

原を発現する組換え狂犬病ウイルスを用いたワクチンは導入する免疫原が明確であり、汎用性も高く、目的抗原の導入効率も良い。そこで我々は組換え狂犬病ウイルスを用いたワクチンの開発のモデルとして、すでに不活化ワクチンが普及しマウスモデルが確立されている日本脳炎ウイルスを選択した。

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し、その性状、効果および安全性を明らかにするために日本脳炎ウイルスの各抗原領域の遺伝子を増幅することである。その結果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蛋白質の各領域の遺伝子をRT-PCRにて増幅した。

B. 研究方法

ウイルスと培養細胞:日本脳炎ウイルスのcDNA作製にあたってはワクチン株である日本脳炎ウイルス中山株を用いた。培養細胞はサル腎由来のVero細胞を用いた (American Type Culture Collection)。

ウイルス力価測定:日本脳炎ウイルスの力価をVero細胞を用いたプラーク法により測定した。6穴プレートにVero細胞を1ウェルあたり 4×10^5 個播種し、一晚培養後10倍階段希釈を行った各希釈ウイルス液を100 μ l接種した。37°Cで90分吸着後1%メチルセルロースを重層し、6日間培養した。3.7%ホルマリンで固定後メチレンブルー染色液で染色しプラーク数からウイルス力価を算出した。

RT-PCR: 2.4×10^9 PFUの日本脳炎ウイルス培養上清からHigh Pure Viral RNA kit (ロシュ)を用いてRNAを抽出した。次いでランダムプライマー (インビトロジェン)を用いて逆転写酵素SuperScript III (インビトロジェン)により日本脳炎ウイルスのcDNAを作製した。PCR反応にはAAAGCTAGCGAAGAATCGAGAGATTAGTGCAGTとTTTGCTAGCTTAGGCTCCTGCGCAGGCTAT (C蛋白質)、AAAGCTAGCGAAGAATCGAGAGATTAGTGCAGTとTTTGCT

AGCTTAAGCATGCACATTGGTCGCTAAGAA (C蛋白質からE蛋白質)、AAAGCTAGCCACCGCCACCATGTGGCTCGCGAGCTTGGAとTTTGCTAGCTTAAGCATGCACATTGGTCGCTAAGAA (prM蛋白質からE蛋白質)、AAAGCTAGCCACCGCCACCATGTGGCTCGCGAGCTTGGAとTTTGCTAGCTTATAGCACCACATACCTCGCCAAAT (prM蛋白質からNS1蛋白質)、AAAGCTAGCCACCGCCACCATGGCTTTGGCCTTCTTAGCCACAとTTTGCTAGCTTATAGCACCACATACCTCGCCAAAT (NS1蛋白質)、AAAGCTAGCCACCGCCACCATGGATTGTTCCCGCCGCTTTTGGTTATとTTTGCTAGCTTATCTCTTCCCTGCTGCAAGTC (NS3蛋白質)を用いて行った。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。

C. 研究結果

ウイルス力価試験:日本脳炎ウイルスのRNAを抽出するにあたり日本脳炎ウイルス中山株のウイルス力価測定をVero細胞を用いて行った。その結果日本脳炎ウイルスの力価は 4.8×10^9 PFU/mlであった。これは日本脳炎ウイルスのRNAを抽出するのに十分なウイルス量であるのでつぎにRT-PCRにより日本脳炎ウイルスの目的遺伝子の増幅を行った。

RT-PCRによる日本脳炎ウイルスの目的遺伝子の増幅: 2.4×10^9 PFUの日本脳炎ウイルス培養上清からRNAを抽出した。抽出したRNAをランダムプライマーを用いて逆転写し、日本脳炎ウイルスの目的遺伝子をPCRにて増幅した。その結果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出来た (図1)。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 (図2)。

D. 考察

本研究の目的は狂犬病ウイルスベクターを応用した安価で迅速なワクチン開発のモデルとしてすでに不活化ワクチンが開発されている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の作製のために、日本脳炎ウイルスの各抗原遺伝子を増幅することである。その結果 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 蛋白質の各領域の遺伝子を増幅した。

日本脳炎ウイルス遺伝子は約 11kb の一本鎖 RNA からなり、5'側より構造蛋白質 C、prM、E 次いで非構造蛋白質 NS1、NS2A、NS2B、NS3、NS4A、NS4B、NS5 が順にコードされている。中和抗体誘導に関わる蛋白質は prM 及び E であり、現在用いられている日本脳炎不活化ワクチンはこれらの構造蛋白質から構成されている。これに対して CTL エピトープを含むと報告されている主な蛋白質は構造蛋白質 E 及び非構造蛋白質 NS3 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。

今後増幅した各日本脳炎ウイルス抗原の遺伝子を用いて組換え狂犬病ウイルスを作製し、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。

E. 結語

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導入すべき日本脳炎ウイルス遺伝子の作製を

おこなった。次年度はそれらの遺伝子を組換え狂犬病ウイルスに導入し、免疫源性を確認する。また、われわれのところで分離同定したマウスに対して病原性が低いフラビウイルスである Yokose ウイルスの導入準備も開始する。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

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

2. 学会発表

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

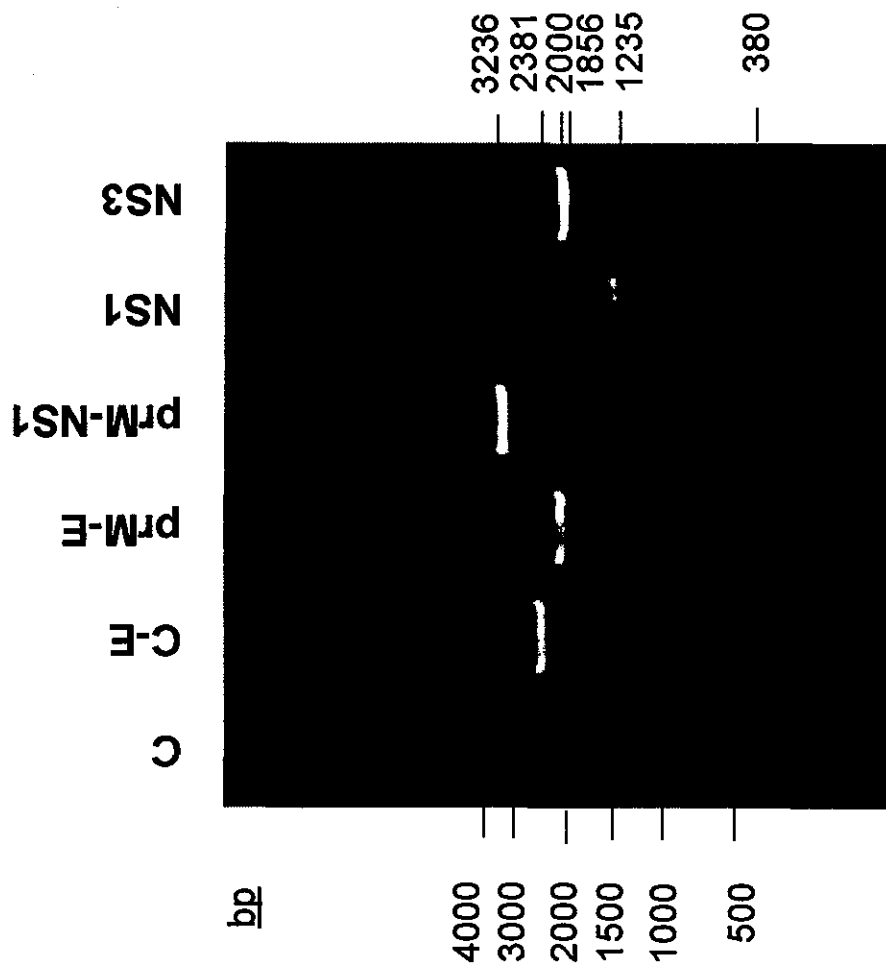


Figure 1

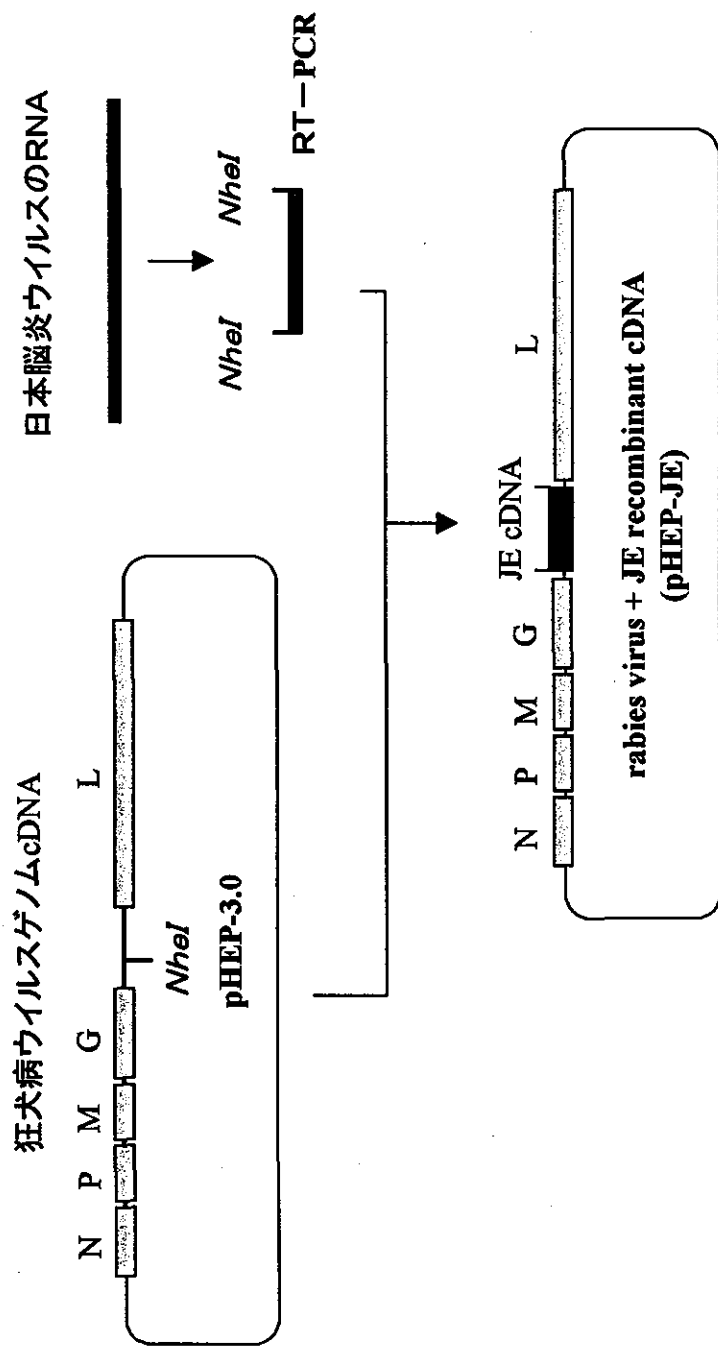


図 2

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

分担研究者：倉根一郎（国立感染症研究所）

協力研究者：高崎智彦（国立感染症研究所）

伊藤美佳子（国立感染症研究所）

研究要旨

デングウイルス感染症は東南アジア、南アジア、南米を中心として広がっており、世界的に最も重要な感染症の一つになっている。わが国でも輸入感染症として診断される症例が増加している。デング熱予防ワクチンはいまだ開発中であり、実用化されていない。本研究では、デングウイルス組み換え狂犬病ウイルスを利用してデングウイルスワクチンの開発を行うために、一部のデングウイルス遺伝子をクローニングしてデングウイルス合成 RNA の作製を試み、TaqMan Real Time RT-PCR（TaqMan RT-PCR）法により、合成 RNA の定量法の確立を行った。これまで、本法によるウイルス遺伝子の検出ユニットは PFU/ml 換算であり、RNA コピー数は明らかにされてこなかったが、合成 RNA を陽性コントロールとして用いた TaqMan RT-PCR の確立により、RNA コピー数の定量が可能となった。

A. 研究目的

デングウイルス感染症は東南アジア・南米を中心として広がっており、再興感染症の一つとして、世界的に重要な感染症になっている。わが国でも輸入感染症として診断される症例が増加している。デング熱予防ワクチンはいまだ開発中であり、実用化されていない。一方、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 を用いることにより異種遺伝子を発現させる

系が確立されている。組み換え狂犬病ウイルスの技術を応用して、デングウイルス組み換え狂犬病ウイルスを作製することにより、安価で免疫原性が高いワクチン開発を行うことが可能となる。

本研究では、デングウイルスワクチン開発を試みる一環として、一部のデングウイルス遺伝子をクローニングしデングウイルス合成 RNA の作製を試み、TaqMan RT-PCR 法により、合成 RNA 定量法の確立を行った。

B. 研究方法

1. Template linearization

RNA を合成するために Template linearization を行う。dengue virus のエンベローププロテイン (E) を組み込んだ plasmid (pcDNATM3.1D/V5-His-TOPO[®]5514bp) は SACII で 3 時間(or over nig) 消化し、plasmid を liner にした。制限酵素で消化したサンプルを GenEluteTM PCR clean-up kit (Rosch) を用い、精製した。

2. RNA 合成

1 で処理した linear DNA template 1 μ g を用いて T7 RiboMAXTM Express Large Scale RNA Production systems (Promega) により RNA 合成を行う。Linear DNA template 1 μ g に RiboMax 2 \times Buffer 10 μ l、Enzyme Mix T7 express 2 μ l に Nuclease Free Water を加えて Total volume を 20 μ l とした。この液を 37 $^{\circ}$ C で 30 分間インキュベートした。

3. DNA template と incorporated rNTPs の除去

反応液に template DNA 1 μ g に対して RQ1 RNase-Free DNase を加え、37 $^{\circ}$ C で 15 分間インキュベートすることにより template DNA を分解した。電気泳動により template の確認を行い、viral RNA isolation kit (Rosh) により精製し、合成 RNA として用いた。また、計算式により RNA copy 数を算出した。

4. TaqMan Real Time RT-PCR

E コード領域をクローニングした合成 RNA の希釈系列 10¹²-10¹/5 μ l を作製し、TaqMan RT-PCR により検出を試みた。

C. 研究結果

Dengue virus type 1 は 4.5 \times 10¹² copies / μ l で、dengue virus type 2 は 7.8 \times 10¹¹ copies / μ l の濃度で RNA が合成された。Dengue virus type 1 は TaqMan RT-PCR により 200 copies / μ l まで、dengue virus type 2 は 20 copies/ μ l まで検出可能であった (図 1, 2)。

D. 考察

デングウイルス遺伝子のクローニング、デングウイルス合成 RNA の作製が確認され、TaqMan RT-PCR 法による合成 RNA の定量が確立された。これまで、TaqMan RT-PCR 法によるウイルス遺伝子の検出ユニットは PFU/ml 換算であり、RNA コピー数は明らかにされてこなかったが、合成 RNA を陽性コントロールとして用いた TaqMan RT-PCR の確立により、RNA コピー数の定量が可能となった。今後、dengue virus type 3, 4 における合成 RNA を新たに作製する。さらに、目的の増幅遺伝子から組み替え狂犬病ウイルスを作製し、各発現蛋白質の抗原性をマウスモデルを用いて明らかにし、デングウイルス組み換え狂犬病ウイルスワクチンの開発を試みる。一方、今回作製した合成 RNA はデング診断における TaqMan RT-PCR 法の陽性コントロールとしても用いることが可能で、本合成 RNA は各地方衛生研究所へ配布される予定である。

E. 結論

デングウイルス組み換え狂犬病ウイルスを利用してデングウイルスワクチンの開発を行うために、一部のデングウイルス遺伝子をクローニングしてデングウイルス合成RNAの作製を試み、TaqMan Real Time RT-PCR (TaqMan RT-PCR) 法により、合成RNAの定量法の確立を行った。

F. 健康危機管理情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

Ito, M., Takasaki, T., Yamada, K., Nerome, R., Tajima, S. and Kurane L: 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.

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

Figure 1

Dengue virus type 1 合成RNA (E領域) によるTaqManRT-PCR

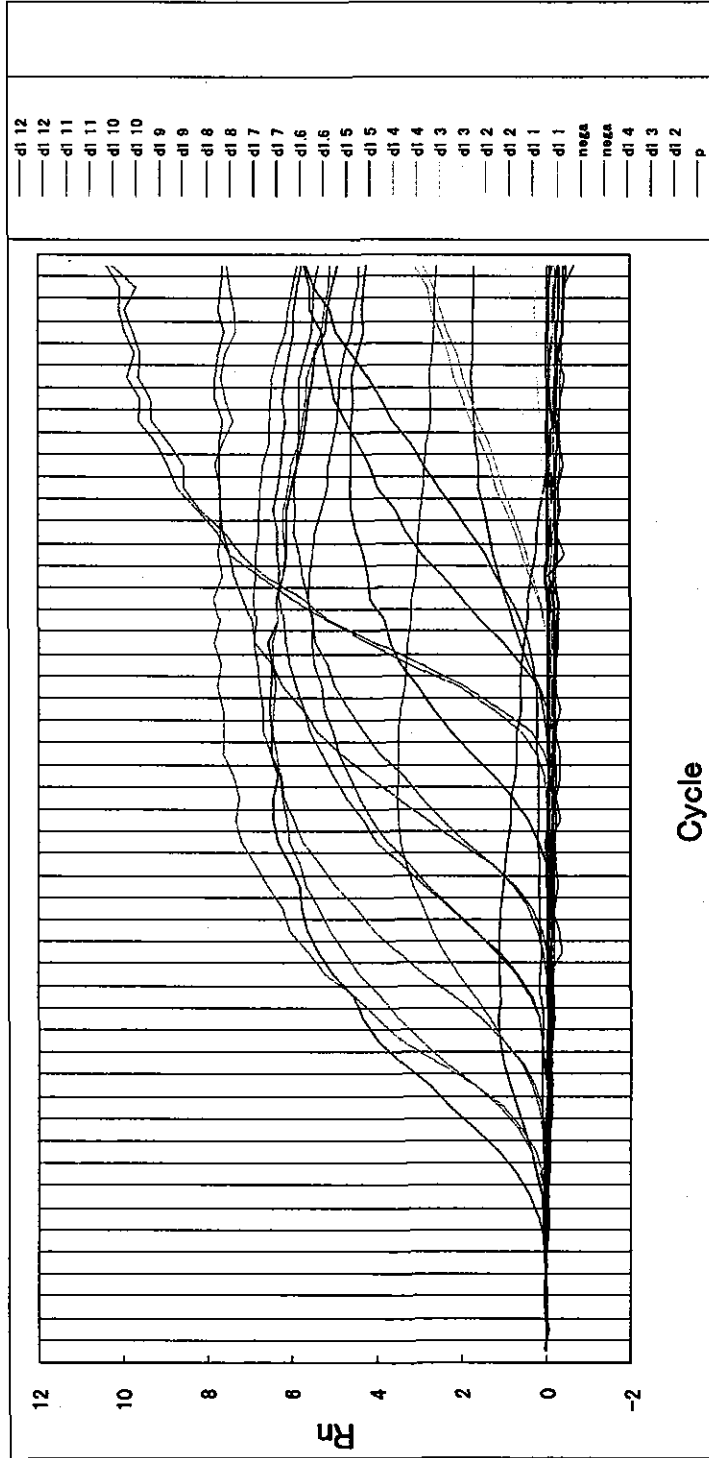
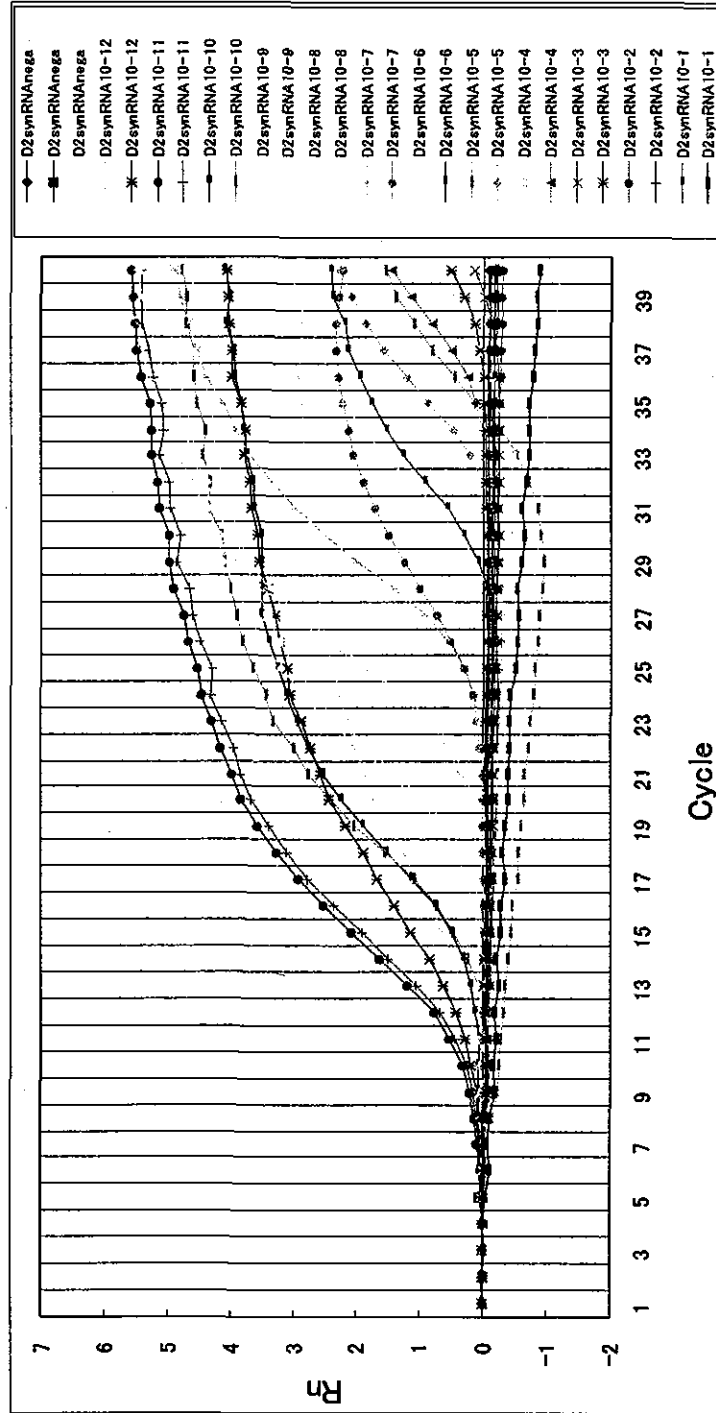


Figure 2

Dengue virus type 2合成RNA(E領域)によるTaqManRT-PCR



センダイウイルスベクターの応用に関する研究

分担研究者 加藤 篤 国立感染症研究所ウイルス第三部室長

研究要旨：センダイウイルスベクターは、約 10 年前に我が国で開発された新規ウイルスベクターである。センダイウイルスは、ほ乳類細胞や鳥類細胞で旺盛に増殖するため、センダイウイルスをベクターとした場合にも、多くの細胞で大量発現を期待できる。新型インフルエンザウイルスの世界的規模での流行に備えるためにはワクチンによる予防がもっとも効果的とされている。しかし、ヒトへの病原性を持った株を、現状の製造工程を使ってそのままワクチンとすることは困難が予想される。そこで、センダイウイルスに H5 型インフルエンザウイルスの HA を組み込み発現させた。発現 H5 蛋白質は、培地にトリプシンを加えなくも感染細胞で HA1 と HA2 に開裂していた。

A. 研究目的

パラミクソウイルス亜科、レスピロウイルス属に分類されるセンダイウイルス(Sendai Virus: SeV)は、広範囲の培養細胞で手軽に増殖し容易に細胞融合などを起こすことから、古くは細胞融合の道具として、近年はリポソームベクターの材料として使われている。ヒトに対してはほとんど病原性を示さないが、一方で、実験感染させたマウスには致死的な肺炎を起すことから、呼吸器感染症のモデルとしてもよく使われている。

完全長のウイルスゲノム cDNA からウイルスを生成することが可能になり、SeV エンジンアリングが可能になった。それに伴い SeV に異種遺伝子発現ユニット組み込むことも可能になり、SeV を新たなウイルスベクターとすることができるようになった。得られた組換え SeV は発現能力を失う事無く何代か継代することができ、その発現強度は、挿入する遺伝子の位置により上下させられ、ゲノムの上流側に組み込んだ場合により高い発現が得ることができる。また、パラミクソウイルスの転写は、一般に遺伝子の両端にある転写開始シグナル(Gene Strat: GS)と転写終結シグナル(Gene End: GE)で制御されており、SeV の GE はすべての遺伝子でまったく共通である(TAAGAAAA)ものの、GS 配列には遺伝子より若干の違いがあり(AGGGxxAAx;x が異なる部分)、発現ユニットに使う GS 配列を選ぶことにより転写の強度をある程度制御することも可能である。

本研究では、異種遺伝子の挿入場所と用いる GS 配列により転写量を変えることが可能

となった SeV ベクターを更に改良あるいは、実際に異種遺伝子を発現させることにより、有効な活用方法を検討することを目的にした。

既に大量発現系として大腸菌を用いた発現系、酵母発現系、そして昆虫ウイルスであるバキュロウイルス発現系が存在し、多くの組換え蛋白質を手にすることができる。しかしながら、複雑な糖鎖構造を持った蛋白質、あるいは本来の哺乳類細胞でなければ立体構造が保持されない蛋白質等も存在し、それらを広範囲な細胞で旺盛な増殖力を示すセンダイウイルスベクターを用いて産生し、活用することを試みた。

B. 研究方法

香港、中国広東省、ベトナムで新型のトリ A 型インフルエンザウイルス(H5N1)のヒトへ重篤な感染が報告され、我が国でもヒトでの発症例はなかったものの新型トリインフルエンザによる養鶏場被害が起こった。スペインカゼに代表されるインフルエンザウイルスの大流行の再燃が心配されている。これらの事から大量のワクチン抗原を準備する技術的な方法を求む気運が高まっている。そこで、本研究ではトリ社会からヒト社会へのインフルエンザウイルスの流行を未然に防ぐために、センダイウイルスベクターがインフルエンザウイルスに対するワクチンと成りえるか否かの検討を行った。

- (1) ヒトへの広範囲な流行が心配される A 型インフルエンザウイルス(H5N1)のサブタイプ 5 の赤血球凝集素(HA)をインフルエンザウイルス A/turkey/Ireland/1378/85 (H5N8)から RT-PCR 法によりクローニングし、組換えセンダイウイルス (SeV/tukH5)を作成した。
- (2) 組換え体を培養細胞に感染させ、間接蛍

光抗体法並びにウエスタン・イムノブロット法を用いてインフルエンザウイルス HA を産生していることを確認した。強毒 H5 型インフルエンザウイルスの性質として、HA タンパク質(HA0)がトリプシン非存在下でも HA1 と HA2 に開裂するが、組み換えセンダイウイルス発現 HA でもその性質が維持されているかをウエスタン・イムノブロット法にて確認した。

C. 研究結果

- (1) 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もに組込んだ組換えセンダイウイルス (SeV/tukH5) を作成した (図 1)。SeV/tukH5 の培養細胞レベルでの増殖性は、親株 SeV と比べてそれほど大きな遜色はなかった。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推定された。
- (2) SeV/tukH5 感染細胞の溶解液を SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動に供し、インフルエンザウイルスに対する抗体でウエスタン・イムノブロットを行い発現蛋白質のサイズを確認したところ、SeV/tukH5 の産生する 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 (図 2)。
- (3) SeV/tukH5 粒子を培養上清から精製したところ、ウイルス粒子中にもインフルエンザウイルス HA 蛋白質が取り込まれていることが認められた。そこで、精製ウイルス粒子をインフルエンザウイルスに対する抗体で処理したのち、金コロイド粒子標識二次抗体を作用させたところ、親株 SeV では電子顕微鏡的に金コロイド粒子が観察されないのに対して、SeV/tukH5 では金コロイド粒子が、ウイルス表面に観察された (図 3)。

D. 考察

SeV に H5 型インフルエンザウイルスの HA 遺伝子を発現ユニットとともに挿入すると、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) を作成することができる。SeV/tukH5 感染細胞ではトリプシン非存在下でも発現 HA 蛋白質が HA1 と HA2 に開裂し、H5 型インフルエンザウイルス本来の HA 蛋白質の性質が、SeV/tukH5 で発現後も維持されていることが示された。

SeV/tukH5 で発現されるインフルエンザウイル

ス HA 蛋白質は、感染細胞にだけ見られるものではなく、センダイウイルス粒子にも取り込まれることが示された。免疫電子顕微鏡像 (図 3) からセンダイウイルス粒子上に密にインフルエンザウイルス HA 蛋白質が存在する様には見えない事、また組換えセンダイウイルスが抗センダイウイルス抗体で完全に中和される (結果未提示) ことから、この HA 蛋白質は特定のシグナルを使って選択的にセンダイウイルス粒子に取り込まれたものではなく、センダイウイルスが出芽時に宿主蛋白質の細胞膜をかぶる際にたまたま近傍にあった HA 蛋白質を取り込んだもの思われた。

このようにして作成された組換え 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。

E. 研究発表

(1) 論文発表

1. 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).
2. 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)

(2) 学会発表

(国際学会)

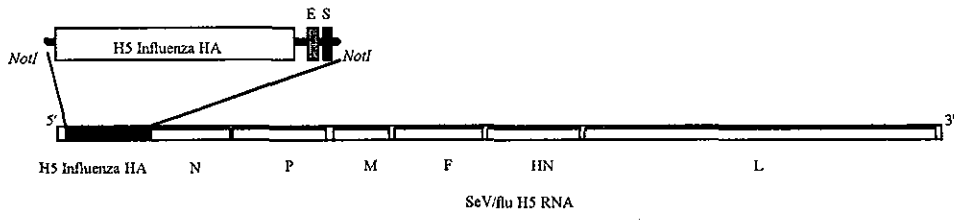
1. Kato, A., C. Cortese-Grogan, S. A. Moyer, F. Sugahara, T. Sakaguchi, M. Tashiro, and Y. Nagai. Characterization of the amino acid residues of Sendai virus C protein that are involved in its interferon antagonism. *Workshop on Replication and Cell Biology of Negative Strand RNA Viruses*. Evanston, IL, USA June 12-16, 2004

(国内学会)

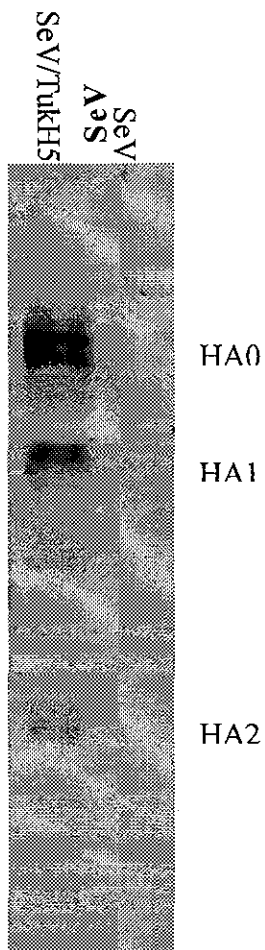
1. 加藤 篤、久保田 耐、田代真人、永井美之：センダイウイルス C 蛋白質による抗インターフェロン効果 第 52 回日本ウイルス

- 学会総会、神戸、2004年11月
2. 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 会日本ウイルス学会総会、神戸、2004 年 11 月
 3. 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 会日本ウイルス学会総会、神戸、2004 年 11 月
 4. 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：センダイウイルス 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 会日本ウイルス学会総会、神戸、2004 年 11 月
 5. 立川(川名)愛、細谷紀彰、加藤 篤、塩田達雄、永井美之、岩本愛吉：エピトープ欠乏 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 会日本ウイルス学会総会、神戸、2004 年 11 月
 6. 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
- (3) 知的財産権の出願・登録状況
なし

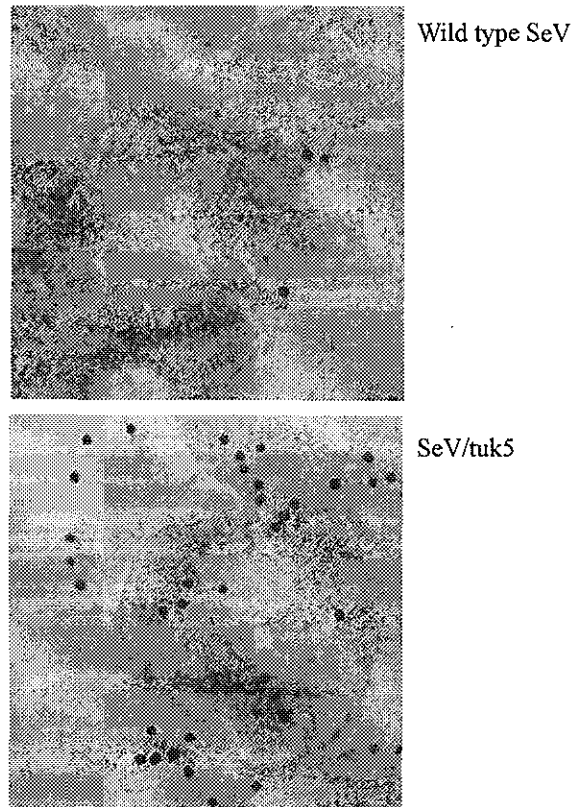
☒ 1



☒ 2



☒ 3



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—

分担研究者 西條政幸(国立感染症研究所ウイルス第1部主任研究官)
協力研究者 網 康至(国立感染症研究所動物管理室主任研究官)
長谷川秀樹(国立感染症研究所感染病理部第2室室長)
永田典代(国立感染症研究所感染病理部主任研究官)
森川 茂(国立感染症研究所ウイルス第1部第1室室長)

研究要旨:近年,生物兵器のひとつとして痘そう(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,我が国においても,その危険性に対する備えの一環として,痘そうワクチンが再生産・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,1970年代に我が国で痘そうワクチンとして認可されている 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(または極めて安全な)新規痘そうワクチンの開発が急務である.天然痘は既に地球上から根絶され(痘そうウイルスは,米国およびロシアの研究所に保管されている),そのため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,カニクイザルに 10^6 pfu のサル痘ウイルス Liberia 株を,それぞれ2頭のカニクイザルに,経鼻的噴霧,または,皮下接種法で投感染させ,感染性ウイルス血症レベル, light cyclus-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.感染カニクイザルでは,体重減少,皮膚病変の出現,ウイルス血症,ウイルスゲノム血症,IL-6 や IFN-gamma などのサイトカインの変動が確認された.感染カニクイザルをモデルとした天然痘に対するワクチン評価法は有用である.

A. 研究目的

バイオテロリズムの危険性はかねてから指摘されていたが,2001年9月11日のニューヨーク市とワシントン DC でのテロ事件,および,その後の炭疽菌によるバイオテロリズム事件の発生で現実のものになった.バイオテロリズムに用いられる病原体には,炭疽菌や痘そうウイルスなどの他に,エボラウイルスなどの出血熱ウイルスが含まれる.中でも痘そうウイルスが用いられるバイオテロリズムが発生した場合には,痘そうウイルスのヒトから

ヒトへの感染性と病原性の高さから,その被害は甚大なものとなることも予想される.そのため,我が国では痘そうワクチン LC16m8 株が再生産され,将来のバイオテロリズムの結果として発生する天然痘の出現に備えている.我が国で備蓄されている LC16m8 株は致死的作用の少ない安全な痘そうワクチンと考えられているが,中和抗体や細胞性免疫を誘導するウイルス抗原を発現する新規ベクターをワクチンとする,より安全なワクチン開発が望まれる.

天然痘は 1977 年のエチオピアでの最後の患者発生が確認されて以来、感染事故を除き自然界からは根絶された。そのため、新規に開発される天然痘ワクチンの有効性の評価には、動物実験に頼らざるを得ない。

そこで、本研究ではチャレンジウイルスとしてヒトでも天然痘様疾患を起こすサル痘ウイルスを、ヒトの動物モデルとしてカニクイザルを用いて、新規天然痘ワクチンの評価における有用性を検討した。ウイルス血症レベル、ウイルスゲノム血症レベルを評価するための方法を開発し、変動するサイトカインの特定し、臨床経過を調べた。また、チャレンジウイルスの接種経路による各指標の違いなどを解析した。

B. 研究方法

- 1) カニクイザル。6 頭のカニクイザル (*Macaca fascicularis*, #4650, #4467, #4595, #4596, #4597, #4598) を用いた。すべて体重 2300 ~ 2800g の雌サルである。
- 2) ウイルス: 国立感染症研究所ウイルス第 1 部に保管されているサル痘ウイルス Liberia 株を用いた。感染価の測定は、Vero 細胞を用いたプラークアッセイによった。
- 3) チャレンジ: 2 頭のカニクイザル (#4650, #4567) には、 10^6 plaque forming unit (pfu) の Liberia 株を皮下接種し (皮下接種非免疫サル群)、別の 2 頭 (#4595, #4596) には、同量のウイルスを鼻腔内噴霧接種した (鼻腔内接種非免疫サル群)。残りの 2 頭 (#4597, #4598) には、はじめに二股針を用いて Lister 株ワクチニアワクチンを右上腕に接種し、その 5 週間後に 10^6 pfu の Liberia 株を鼻腔内接種した (鼻腔内接種 Lister 免疫サル群)。チャレンジウイルス接種後、毎日、食餌摂取量、飲水量、活動性、便性状を観察した。また、2~4 日おきに麻酔下で体重、体温を測定し、さらに末梢血 (4~5ml) を採取した。
- 4) ウイルス血症: ヘパリン採血された末梢血液 3ml を 10ml の PBS で洗浄し、1500 回

転/分で遠心処理した。次いでバフィーコート部分を採取し、再び 10ml の PBS で洗浄後、1500 回転/分で遠心処理し、バフィーコート部分を Vero 細胞の単層とともに 2%FBS 含有 MEM で 3 日間共培養した。培養 3 日後には、培養液を除き PBS で一度洗浄後、2%FBS 含有 MEM でさらに 3 日間培養した。計 6 日間培養したところで、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た。尚、サル痘ウイルスは、細胞-細胞の感染の拡がりによってプラークを形成するため、この方法で得られたプラークは、血中に存在する感染性ウイルスを反映するものと考えられる。

- 5) ウイルスゲノム血症: Light cycler-polymerase chain reaction (LC-PCR) を用いてウイルスゲノム血症レベルを測定した。Forward プライマーには 5'-GAG ATT AGC AGA CTC CAA-3' を、LCRed プロンプとして 5'-LCRed640-CTA GAT TGT AAT CTC TGT AGC ATT TCC ACG GC-3'-phosphorylation を、FC プロンプとして 5'-GCA GTC GTT CAA CTG TAT TTC AAG ATC TGA GAT-3'-Fluorescein を、reverse プライマーとして 5'-TCT CTT TTC CAT ATC AGC-3' を用いた。これらのプライマーおよびプロンプはサル痘ウイルスの ATI 遺伝子の塩基配列の特徴からデザインされた。LC-PCR は、Light Cycler-PCR (Roche Diagnostics 社, Mannheim, ドイツ) を用いて行われた。尚、サンプルからのウイルス遺伝子の精製は、Viral Nucleic Acid Kit (Roche Diagnostics) を用いて行われた。遺伝子検出感度を決定するための standard 遺伝子には、濃度が計測されているサル痘ウイルス Liberia 株の部分 ATI 遺伝子が挿入された pGEM-T-easy ベクターを用いた。
- 6) 血中サイトカイン: 血中サイトカイン [interleukin (IL-2), IL-4, IL-6, IL-10, Interferon (IFN)-gamma, TNF-alpha] 濃度は、Rhesus Monkey IL-2, Monkey IL-4, Human IL-6, Rhesus Monkey IL-10, Monkey

IFN-gamma, Monkey TNF-alpha (Biosource International 社)を用いた ELISA 法により測定された。

- 7) 感染実験:カニクイザルを用いたサル痘ウイルスの感染実験は、国立感染症研究所の高度安全研究施設内で行われた。この感染実験は、国立感染症研究所実験動物委員会の承認のもとに行われた。

C. 結果

- 1) 臨床症状:鼻腔内接種非免疫サル群(#4595, #4596)には、チャレンジ後 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た(図 1)。感染後 16 日頃から症状の改善がみとめられた。皮下接種非免疫サル群(#4650, #4567)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。チャレンジウイルス接種部位は 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。#4650 では、全体で 30 個程の水疱性皮膚病変が出現し、一方、#4567 では、500 を越える水疱性病変が出現し、チャレンジウイルス接種後 10 日目に死亡した。一方、鼻腔内接種 Lister 免疫サル群(#4597, #4598)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。

- 2) サイトカイン血症::各個体におけるウイルス分離成績と LC-PCR によるウイルスゲノム血症の推移を図 2 にまとめた。鼻腔内接種非免疫サル群(#4595, #4596)および皮下接種非免疫サル群(#4650, #4567)においては、調べたサイトカインの中で、IFN-gamma と IL-6 の血中濃度の上昇が観察され、その他にはその変化が観察されなかった。チャレンジウイルス接種後、1 週間以内に、IFN-gamma および IL-6 の血中濃度が高まり、10 日目以降に低下する傾向が認められた。興味深いことに、死亡したサル

#4567 では、IL-6 濃度の上昇が著しく、それに比べて、IFN-gamma の濃度の上昇は軽微であった。鼻腔内接種 Lister 免疫サル群(#4597, #4598)には、IFN-gamma および IL-6 の血中濃度の上昇は認められなかった。

- 3) ウイルス血症とウイルスゲノム血症:鼻腔内接種非免疫サル群(#4595, #4596)では、リンパ球からのウイルス分離検査によればチャレンジウイルス接種後 4 日目から 13 日にウイルスが分離された(未公表)。LC-PCR によるウイルスゲノム血症の解析によると、ウイルスが分離され始めた 4 日目にはウイルスゲノムは検出されていないが、8 日目から 13 日目までの間でウイルスゲノム血症が認められ、ウイルス分離成績とほぼ一致した。皮下接種非免疫サル群(#4650, #4567)においては、感染 3 日後には、ウイルス血症が確認された。LC-PCR によるウイルスゲノム血症の検討では、感染後 7 日目と 9 日目に得られた血液が陽性を呈し、その後得られた血液は陰性を呈した。ただし、サル#4567 は、感染後 10 日目に死亡している。一方、鼻腔内接種 Lister 免疫サル群(#4597, #4598)からは、ウイルス血症およびウイルスゲノム血症は確認されなかった。

D. 考察

本研究においては、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の開発するために欠かせない霊長類を用いたモデルを、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。対照として、Lister 株痘そうワクチン接種により免疫を付与したサルを用いた。非免疫サルにサル痘ウイルスを経鼻接種または皮下接種の方法でチャレンジしても、サル痘ウイルス感染による症状を呈する。皮下接種経路でウイルスを感染させた場合の方が経鼻接種の場合に比べて症状が重く、ウイルス血症の出現が早い傾向が認められた。より症状の重くなる系でワクチン効果の評価を行なうためには、

チャレンジウイルスは皮下接種法によるべきであろう。

今回の検討により、開発されたウイルスゲノム検出法としての LC-PCR 法は、20 コピー程度以上のウイルスゲノムを検出できることも確認された(データ未公表)。尚、サル痘ウイルス遺伝子を検出するための LC-PCR におけるプローブは、他のオルソポックス属ウイルスにはないサル痘ウイルスに特異的な塩基配列に基づいて設計されており、この LC-PCR は、ヒトサル痘の診断や天然痘の鑑別診断に有用と考えられる。

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。

E. 結語

新規に開発される痘そうワクチンの評価を行なうための霊長類を用いたモデルを開発した。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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.
- 2) 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.
- 3) 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.

- 4) 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.
- 5) 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* 5:577(1-2):187-92
- 6) 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
- 7) 西條政幸. (2004) サル痘ウイルス感染症. *臨床と微生物* 31:21-24.
- 8) 西條政幸. (2004) ウイルス性出血熱. *化学療法の領域* 20:224-228.
- 9) 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. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)
特許取得: 該当なし

3. 学会発表

- 1) 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
- 2) 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

- 3) 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
- 4) 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
- 5) 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
- 6) 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
- 7) 西條政幸, 福士秀悦, 萩野利夫, 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
- 8) 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
- 9) 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
- 10) 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
- 11) 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
- 12) 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
- 13) 福士秀悦, 水谷哲也, 西條政幸, 倉根一郎, 西條政幸. 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
- 14) 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

図 1. 各個体(上段:鼻腔内接種非免疫サル群;中段:皮下接種非免疫サル群;下段:鼻腔内接種Lister免疫サル群)における体重の推移。

