

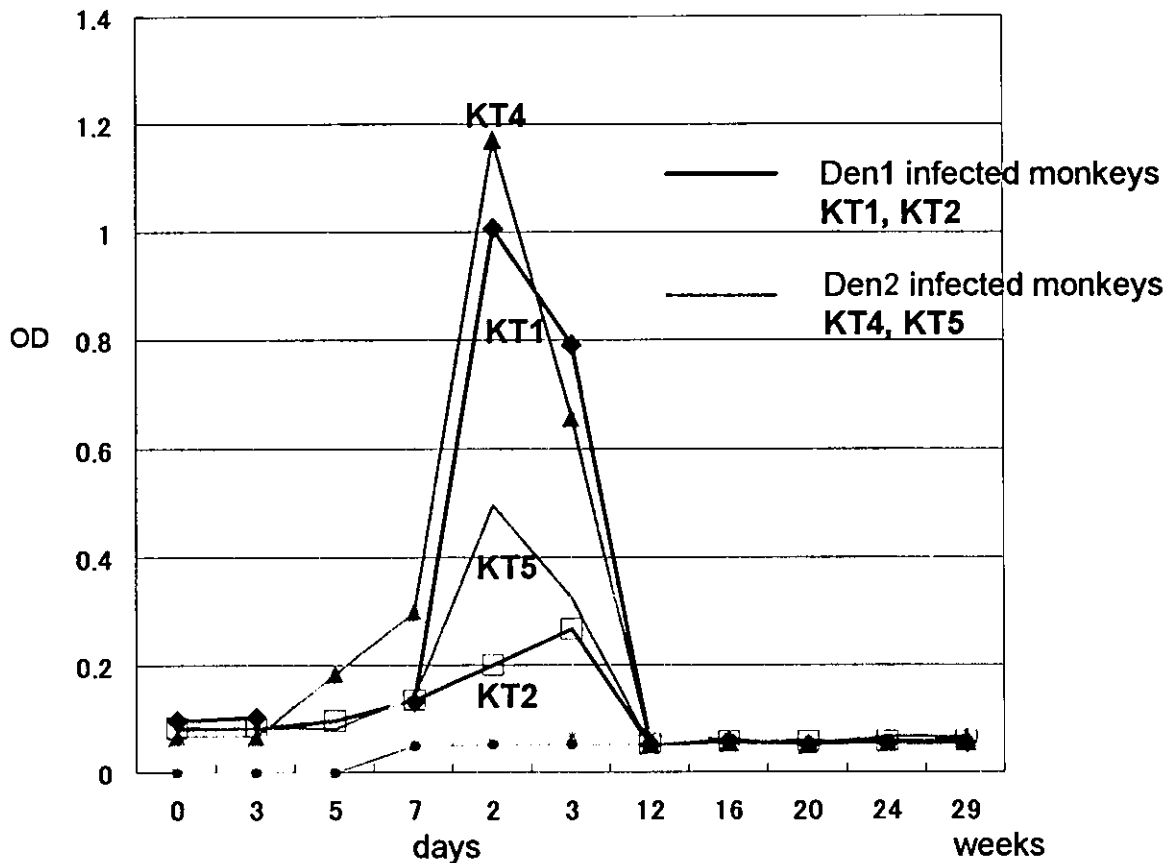
Table1

TaqMan Real Time RT-PCRによるデングウイルスの検出

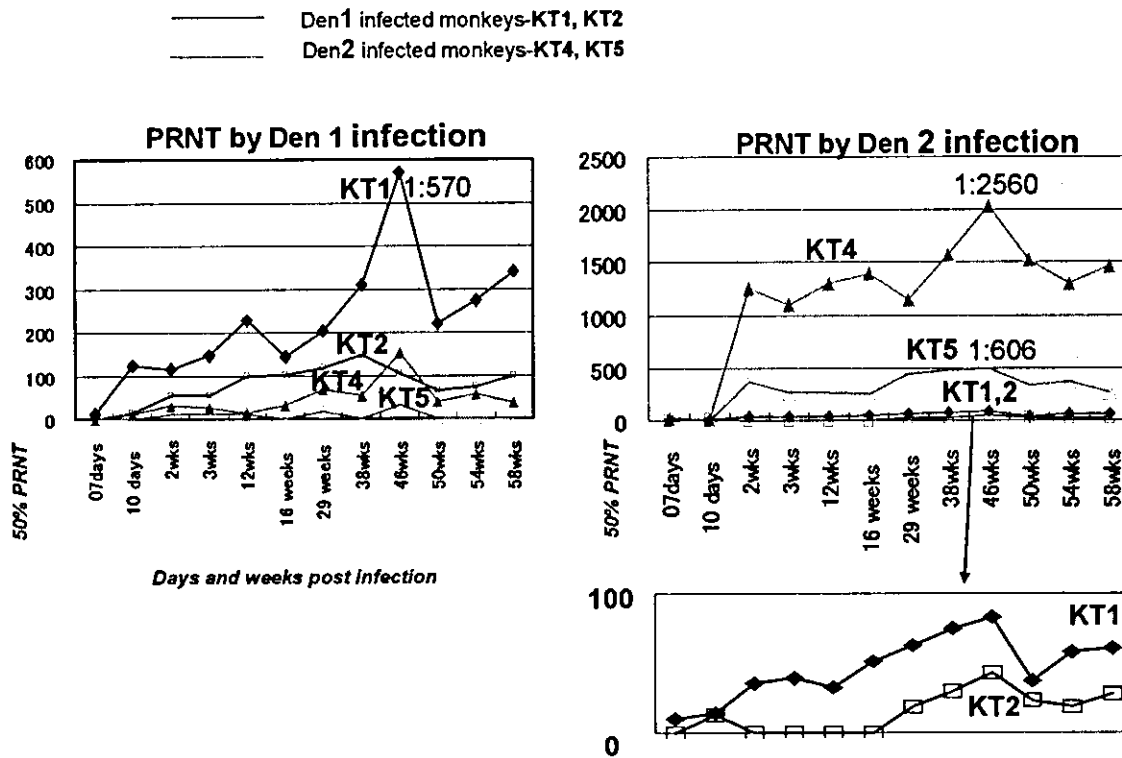
Dengue virus serotypes used for infection	Monkeys	Days after infection of viruses					
		3days (Plaque titration)	5	7	10	14	21
Den1	KT1 (serum)	+ (3×10^3 PFU/ml)	-	-	-	-	-
	(PBMC)	-	-	-	-	-	-
	KT2 (serum)	-	-	-	-	-	-
	(PBMC)	-	-	-	-	-	-
Den2	KT4 (serum)	+ (4×10^2 PFU/ml)	-	-	-	-	-
	(PBMC)	-	-	-	-	-	-
	KT5 (serum)	+ (7.5×10^2 PFU/ml)	-	-	-	-	-
	(PBMC)	-	-	-	-	-	-

IgM 抗体価

Fig.1

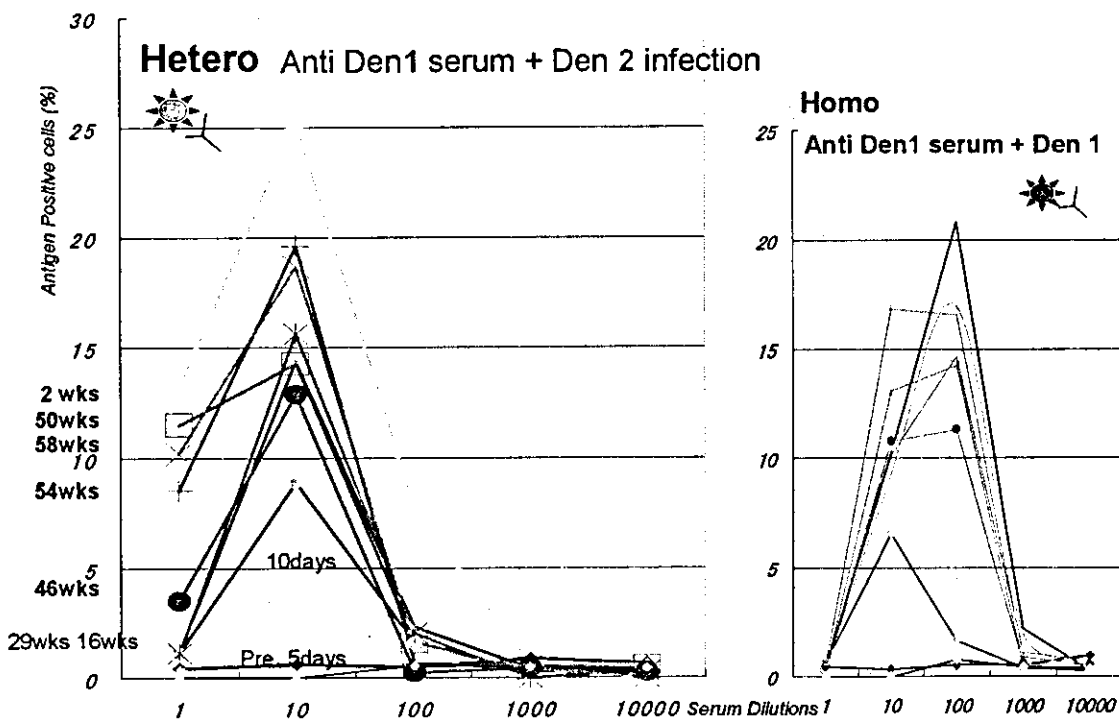


Den 1 および Den2に対する中和抗体価 Fig.2



Antibody-mediated enhancement effect Fig3

- In case of KT2-



デング 4 価 DNA ワクチンのマウスにおける評価

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 小杉 紗織（神戸大学医学部医療基礎学講座）
井本 淳一（神戸大学医学部医療基礎学講座）

研究要旨 これまでデング 1 型及び 2 型に対する DNA ワクチンを作製した。今回、3 型及び 4 型に対する DNA ワクチンを作製し、すべての血清型に対する混合ワクチン（デング 4 価 DNA ワクチン）のマウスにおける抗体誘導能を評価した。100 μ g の DNA（各血清型について 25 μ g）を 1 回投与した BALB/c マウスは、3 週目に 70% プラーク減少法で低いレベル（1:10）あるいは検知レベル未満（<1:10）の抗体価しか示さなかったが、2 回目の免疫から 3 週目（初回免疫から 6 週目）には 1:20-1:80 の中和抗体価を示し、26 週目まで抗体価を保持した。また、単価 DNA ワクチンと比較することにより、4 価 DNA ワクチンによる抗体誘導は、各血清型間で干渉を起こさないことが明らかにされた。さらに、4 価ワクチン免疫マウスに感染性ウイルスを接種することにより中和抗体の 2 次応答が認められた。この中和抗体は、単価ワクチン免疫マウスの 2 次応答で誘導された中和抗体より、高いレベルの型交差性を示した。

A. 研究目的

デング熱/デング出血熱は、年間 1 億人の罹患者が推定されている世界規模の蚊媒介性疾患であるが、認可ワクチンはなく特異的な治療法も確立されていない。デングワクチン開発の基本的な考え方は、中和抗体の誘導である。デングウイルスは 4 つの血清型をもつが、初回感染と同じ型の 2 度目の感染は防御されることが疫学的に証明されており、防御の中心的役割を果たすのは中和抗体と考えられているからである。しかし、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感染増強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ため、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。

デング熱/デング出血熱に対する 4 価ワクチンは、弱毒ワクチン及びキメラワクチンの戦略で、それぞれ臨床試験及び前臨床段階の試験にまで進んでいる。しかし、これら感染性のある混合ワクチンにはウイルス間相互の「干渉作用」があるため、ドーズ調整に難があると言われている。一方、DNA ワクチンはウイルス感染に見られるような干渉作用は理論的には考えにくく、混合ワクチンの戦略に適していると思われる。さらに、昨年報告したように、抗原産生能が 1000 倍以上異なる DNA ワクチンでも、中和抗体誘導能はあまり差がなく、ドーズ調整はそれほど困難ではないと推察される。

当研究室ではデング 1 型及び 2 型に対する DNA ワクチン（それぞれ pcD1ME 及び pcD2ME）を既に報告したが、今回 3 型及び 4 型に対する DNA ワクチン（それぞれ pcD3ME 及び pcD4ME）を作製し、マウスに混合投与することにより 4 価 DNA ワクチンの評価を行った。

B. 研究方法

ウイルス

デング 1 型ウイルス (DENV1) 望月株、デング 2 型ウイルス (DENV2) ニューギニア C 株、デング 3 型ウイルス (DENV3) H87 株及びデング 4 型ウイルス (DENV4) H241 株を用いた。中和試験

及び ELISA の抗原には Vero 細胞に感染して得られた培養液、また DNA 免疫マウスの 2 次免疫応答を調べるための接種ウイルスには 10% 感染マウス脳乳剤を用いた。

DNA ワクチン：pcD1ME (望月株) 及び pcD2ME (ニューギニア C 株) 作製と同様の手法で、pcD3ME 及び pcD4ME を作製した。すなわち、それぞれ H87 株及び H241 株の prM/E 遺伝子を pcDNA3 ベクターに組み込んだ。組み込まれた prM/E 領域は、シーケンシングの結果、報告されている配列と表 1 に示すような差異が見られた。特に pcD4ME は 1 アミノ酸が付加する大きな違いであった。pcD4ME 作製に用いた H241 株は米国 Yale 大学由来であり、報告されている塩基配列は米国 NIH に保管されている H241 株である。確認のため、国立感染症研究所保管株を高崎智彦博士より分与を受け、塩基配列を調べた結果、Yale 大学株と同じ配列であった。

すべてのプラスミド DNA は、キアゲン DNA 精製キットで精製して、発現実験やマウス実験に用いた。

発現実験：Vero 細胞に 2.0 µg の pcD3ME あるいは pcD4ME 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。細胞内の抗原発現を型特異モノクローナル抗体を用いた免疫染色により検出した。細胞外に放出された抗原は、ELISA 及び ショ糖密度勾配遠心により解析した。

マウス実験：1 型から 4 型に対する DNA ワクチンの混合液 (各 25 µg、計 100 µg/匹) を 4 週齢の BALB/c マウスに 3 週間隔で 2 回免疫した。対照として各型に対する単価 DNA ワクチン投与群及び pcDNA3 投与群を設けた。接種は、大腿部に針無注射器 (シマジエット、島津製作所) を用いて行った。採血は、眼窩静脈叢から行い、ELISA 抗体値を個々の血清で、中和抗体価をプール血清で測定した。2 次免疫応答を調べるための感染性ウイルスの接種は、 10^7 FFU を腹腔内に行った。

中和試験：2 倍階段希釈した血清とウイルスの混合液に補体を最終濃度 5% になるように添加し、70% フォーカス減少法で判定した。フォーカス法は、Vero 細胞を感染後 3-4 日目に固定し、DENV 特異的モノク

ローナル抗体あるいは抗 DENV 過剰免疫マウス腹水 (HMAF) を反応させた後 ABC 染色し、フォーカスを計数した。

ELISA：DENV1-DENV4 の各型に対するウサギ抗 Dengue ポリクローナル血清を感作したマイクロプレートに、抗原 (Vero 細胞由来の感染培養液)、100 倍希釈マウス血清、アルカリフォスファターゼ標識抗マウス IgG、パラニトロフェニルリン酸を順に反応させた。各プレートには一定の陽性対照を置き、この対照で得られた吸光度で換算した値を ELISA 抗体値とした。

(倫理面への配慮)

本研究における動物実験は、神戸大学大学院医学系研究科動物実験委員会により承認された。

C. 研究結果

pcD3ME 及び pcD4ME 発現タンパクの解析：pcD3ME あるいは pcD4ME をトランスフェクトした Vero 細胞は、それぞれ DENV3 あるいは DENV4 特異モノクローナル抗体により染色されたが、他の型に特異な抗体に対しては反応しなかった。また、トランスフェクションから 1-2 日目の細胞培養液には ELISA により E 抗原が検出され、pcD3ME あるいは pcD4ME が産生する E 抗原は細胞外に放出されることが明らかにされた。さらに、この培養液をショ糖密度勾配遠心により分画した結果、DENV3 あるいは DENV4 感染培養液で得られたピリオンのピークとの相対的な位置関係から、トランスフェクトした細胞から放出された E 抗原は粒子型であることが示唆された (図 1)。

100 µg の pcD3ME 及び pcD4ME を針無注射器を用いて投与した 4 週齢の BALB/c マウスには、70% プラーク減少法で検知できる中和抗体が誘導された (図には示さず)。また、これら免疫マウスにおいて、 10^7 PFU の H87 株及び H241 株を接種後 4 日目には中和抗体価が上昇し、記憶 B 細胞の誘導も示された (図に示さず)。

4 価 DNA ワクチンの抗体誘導能：4 価 DNA ワクチンの抗体誘導能を検討するために BALB/c マウスを用いて予備の実験を行った (表 2)。いずれの実験も、100 µg の 4 価 DNA ワクチンを用いて 2 回免疫し、2

回目の免疫から 3-5 週目に採血しプール血清の中和抗体価を測定した。陰性対照である pcDNA3 接種群は、すべての型に対して検知レベル以下 (<1:10) であった。実験 1 及び 2 では、低いながらもすべての型に対し中和抗体を誘導した。実験 3 では、高いレベルの中和抗体の誘導がみられた。接種の間隔が長いことが高い抗体価につながったと考えられる。以上の結果から、4 価 DNA ワクチンは、すべての型に対して中和抗体をマウスに誘導することが示された。

型間の干渉性：次に、ワクチン接種後の経時的な抗体価の変動を調べるとともに、混合免疫による干渉を検討するために、4 価 DNA ワクチンと単価 DNA ワクチンの中和抗体誘導能を比較した。1 群 6 匹の BALB/c マウスに、100 µg の 4 価 DNA ワクチン及び 25 µg の各単価 DNA ワクチンを 3 週間隔で 2 回接種した。陰性対照として pcDNA3 接種群を設けた。初回免疫後、3 週間隔で 12 週まで採血した。中和抗体価はプール血清を用いて求め、また ELISA 抗体値は個々の血清から得られた値を平均した。4 価 DNA ワクチン免疫群の血清については、4 つの型に対する抗体レベルを、また単価 DNA ワクチン免疫群の血清についてはワクチンの型と同じ型に対する抗体のレベルを図 2 に示した。4 価 DNA ワクチン免疫群、単価 DNA ワクチン免疫群ともに、6 週目あるいは 9 週目までに中和抗体価及び ELISA 抗体値の上昇が認められた。

中和試験及び ELISA は、ともに血清型ごとに測定に用いる抗原が異なることから、型間の値の高低を比較することはできないが、同じ抗原を用いて測定した場合には比較は可能である。4 価 DNA ワクチン免疫群における DENV1、DENV2 及び DENV3 に対する中和抗体価のレベルは、単価 DNA ワクチン免疫群とほぼ同等であったのに対し、DENV4 に対する中和抗体価のレベルは 9 及び 12 週目に 4 価 DNA ワクチン免疫群が単価 DNA ワクチン免疫群より高い値を示した。この傾向は ELISA でも同様に認められた。pcD4ME 単価免疫群に比べ、4 価ワクチン免疫群における DENV4 に対する ELISA 抗体値は 9 週目 ($P<0.05$) 及び 12 週目 ($P<0.01$) で有意に高かった。

以上の結果から、4 価 DNA ワクチンは、

型間の干渉なく免疫原性を示すことが明らかにされた。また、4 型に見られたように、単価での投与では低い免疫のレベルを、他の型と混合投与することによって高められる効果も示された。

単価 DNA ワクチン免疫群の血清について、4 つの型に対する中和抗体価を調べたが、ワクチンの型と異なる型に対する中和抗体はほとんど検知レベル以下であった (図には示す)。しかし、ELISA で調べた結果、交差反応性抗体はいずれの型に対しても高いレベルで誘導されていた (図 3)。

持続性：上記の実験で用いた 4 価 DNA ワクチン免疫マウスから、接種後 26 週目に得られたプール血清を用いて中和試験を行った。その結果、DENV1-DENV4 に対する中和抗体価は 70% フォーカス減少法で順に 1:80、1:320、1:160、1:40 であった。持続性は DNA ワクチンの特徴であるが、むしろ全体的に上昇傾向が認められた。

2 次免疫応答：次に、4 価 DNA ワクチンによって誘導された中和抗体が、感染にตอบสนองしてどの程度上昇するかを調べた。100 µg の 4 価 DNA ワクチンにより 3 週間隔で 2 回免疫したマウスに、初回免疫後 6 週目に 10^7 FFU の各ウイルスを腹腔内に接種した。陰性対照として pcDNA3 接種マウスを用いた。接種後 14 日目までに得られたプール血清を用いて、接種抗原と同型の DENV に対する中和試験を行い、結果を図 4 に示した。4 及び 7 日目に、4 価 DNA ワクチン免疫群は、対照の非免疫群より高いレベルの中和抗体を誘導した。この結果は、4 価 DNA ワクチン免疫マウスにおいて、すべての型に対し記憶 B 細胞が誘導されていることを示す。

2 次免疫応答で誘導された交差性中和抗体：4 価 DNA ワクチン免疫後に、ある型の DENV を接種することにより誘導された中和抗体の型間交差性を調べた。DENV 接種後 14 日目に得られた各群のプール血清に含まれる、すべての型に対する中和抗体価を図 5 (上のパネル) に示す。比較のために、100 µg の各単価 DNA ワクチンで 2 回免疫した後、同型のウイルス (10^7 FFU) を接種することにより高度免疫状態になったマウスの血清を用いて、すべての型に対し中和試験を行った (図 5、下のパネル)。

単価ワクチン接種群では、交差性の低い中和抗体が誘導された。例えば、DENV1に対する中和抗体価は pcD1ME 免疫マウスで 1:320 を示したのに対し、他の型で免疫したものは高くとも 1:10 であり、32 倍以上の差を示した。同様に他の血清型に対する中和抗体価は同じ型で免疫したマウスは、他の型で免疫したマウスと 16 倍以上の差があった。一方、4 価ワクチン接種群では、交差性の高い中和抗体が誘導された。特に、DENV2 及び DENV3 に対する中和抗体レベルは、いずれの型を接種に用いた場合においても非常に高く、接種ウイルスと同じ型に対する中和抗体のレベルと同等であった。一方、DENV1 及び DENV4 に対する中和抗体価は、接種ウイルスと同じ型に対する中和抗体のレベルが最も高かった。しかし、異なる型に対しても、単価 DNA ワクチン免疫マウスにみられた交差のレベルより全体的に高い中和抗体のレベルを示した。

D. 考察

DENV3 及び DENV4 に対する DNA ワクチンに関してはこれまで報告がない。今回、prM/E 遺伝子を組み込む戦略で作製した pcD3ME 及び pcD4ME は、pcD1ME 及び pcD2ME と同様に、産生抗原を細胞外に放出した。我々は、これらの同じ戦略の DNA ワクチンを混合する形で 4 価 DNA ワクチンを作製した。DNA ワクチンによる Dengue 4 価ワクチンは、世界初の試みとなる。

今回作製した 4 価 DNA ワクチンはすべての型に対して中和抗体を誘導し、干渉を起こさないことが示された。しかも、型によっては相互の抗体誘導を高め合うような作用のあることも示された。したがって DNA ワクチンの戦略は DENV に対する混合ワクチンの開発において極めて有望であると考えられる。また、4 価 DNA ワクチン免疫マウスにある型の DENV を接種した場合、他の型に対する中和抗体価も効率よく上昇した。この点も、異なる型の暴露を比較的高頻度を受ける Dengue の流行地域における、4 価 DNA ワクチンの有用性を示唆する。

複数のワクチンの混合投与により、お互いの免疫原性を高めあう効果は、型間の交

差性エпитープによると考えられる。この効果は、4 価 DNA ワクチン、すなわち DNA ワクチン同士の混合投与では DENV4 に対してしか見られなかったが、4 価 DNA ワクチン接種マウスにある型の DENV を接種した場合、すべての型に対して認められた。タイプの異なる免疫源 (DNA ワクチンとウイルス) の混合投与により中和抗体上昇効果が顕著になると推測される。中和試験の特異性が高い理由は、1 つの型の免疫により誘導される中和抗体が他の型をあまり中和しないからである。すなわち、中和エпитープは原則的に型交差性ではない。しかし、免疫原のタイプが異なる場合、中和エпитープの免疫原性がある程度、型交差性に働くのかもしれない。

DENV においては、マウスにおける感染防御実験の系として脳内接種による攻撃が行われてきた。しかし、感染性ウイルスを脳内に接種した後に生死で防御効果を判別する方法は実際のヒトにおける病態を反映しておらず、マウスにおけるワクチンの脳炎防御がヒトにおける Dengue 熱/Dengue 出血熱の防御とどれくらい関係しているのかが不明である。本研究では、感染防御実験の代替として、ウイルス接種後の中和抗体の 2 次応答を調べた。血液中のウイルスを中和抗体により排除することが、病状の軽減のみならず伝播防止に結びつくと考えられる。通常、ウイルス血症は感染後 2 日目から 3-5 日間続くと報告されているので、感染を受けてから短期間 (遅くとも 4 日目) に上昇する中和抗体により血液中のウイルスが効果的に排除できると考えられる。今後、4 価 DNA ワクチンの防御効力は、Dengue の動物モデルとして確立されているサルを用いて正しく評価する必要がある。

E. 結論

Dengue 4 価 DNA ワクチンは、血清型間の干渉なく、すべての型に対して中和抗体をマウスに誘導することが明らかにされた。また、感染性ウイルスを接種することにより中和抗体の 2 次応答が認められ、特に交差性中和抗体の効率の良い上昇が認められた。

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, Mizue Shoda, Naoko Ajiro and Takashi Kondo: Development and evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay for quantifying antibodies to Japanese encephalitis virus nonstructural 1 protein to detect subclinical infections in vaccinated horses. *Journal of Clinical Microbiology* 42, 5087-5093 (2004)

Jun-ichi Imoto and Eiji Konishi: Needle-free jet injection of a mixture of Japanese encephalitis DNA and protein vaccines: a strategy to effectively enhance immunogenicity of the DNA vaccine in a murine model. *Viral Immunol*, 18, 206-213 (2005)

小西英二. 日本脳炎ウイルス自然感染率: ワクチン不要論は正しいか? 『臨床とウイルス』32, 372-379 (2005)

2. 学会発表

Eiji Konishi, Mizue Shoda, Tomohiro Suzuki, Takashi Kondo, Satoru Arai, Keiko Taya, Nobuhiko Okabe: Recent Japanese Encephalitis Virus Activity in Japan: Can We Stop Vaccination? Fortieth Anniversary Joint Working Conference on Viral Diseases US-Japan Cooperative Medical Science Program. Kyoto (2004).

石川 知弘、奴久妻 聡一、高崎 智彦、倉根 一郎、小西 英二: ウエストナイルウイルス prM/E 遺伝子組込み DNA ワクチンの作製とマウスにおける評価。第 39 回日本脳炎ウイルス生態学研究会 (2004)。

井本 淳一、小杉 紗織、小西 英二: デング 4 価 DNA ワクチンの作製とマウスにおける免疫原性。第 39 回日本脳炎ウイルス生態学研究会 (2004)。

正田 瑞恵、近藤 高志、小西 英二: 栗

東及び美浦におけるウマの日本脳炎ウイルス NS1 抗体レベルの経年変化。第 39 回日本脳炎ウイルス生態学研究会 (2004)。

小杉 紗織、奴久妻 聡一、小西 英二: デング 2 型ウイルスがマウスに誘導する抗体のクローナルレベルにおける解析: 抗体可変領域の推定アミノ酸配列における個体差。第 39 回日本脳炎ウイルス生態学研究会 (2004)。

小西 英二: 日本脳炎ウイルス自然感染率: ワクチン不要論は正しいか? 第 45 回日本臨床ウイルス学会 (2004)。

山中 敦史、小杉 紗織、小西 英二: デング免疫マウスを用いて作製したモノクローナル抗体のキャラクタライゼーション。第 11 回トガ・フラビ・ペスチウイルス研究会 (2004)。

石川 知弘、小西 英二: 日本脳炎ウイルスサブゲノミックレプリコンの構築。第 52 回日本ウイルス学会学術集会・総会 (2004)。

正田 瑞恵、新井 智、多屋 馨子、岡部 信彦、小西 英二: 近年の日本におけるヒトの日本脳炎ウイルス自然感染状況。第 52 回日本ウイルス学会学術集会・総会 (2004)。

小杉 紗織、井本 淳一、小西 英二: デング 4 価 DNA ワクチンのマウスにおける抗体誘導能。第 52 回日本ウイルス学会学術集会・総会 (2004)。

小西 英二、正田 瑞恵、近藤 高志: 日本脳炎ウイルス NS1 抗体レベルの経年変化: 茨城県及び滋賀県におけるウマを対象とした調査。第 52 回日本ウイルス学会学術集会・総会 (2004)。

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表1. pcD3ME及びpcD4MEに組み込まれたprM/E遺伝子の塩基配列及び推定アミノ酸配列とGenBankに登録されているH87株及びH241株の各配列との相違点

DNA	領域	塩基番号	塩基		アミノ酸	
			登録	ワクチン	登録	ワクチン
pcD3ME	E	1,362	T	C	Val	Ala
	E	1,805	A	G	Lys	Glu
pcD4ME	prM	449	T	C	Ile	Thr
	E	905	C	T	Ser	Leu
	E	1,255	A	G	Ile	Val
	E	1,301	C	T	Thr	Ile
	E	1,589	T	C	Ile	Thr
	E	1,669	A	G	Met	Val
	E	1,673	T	A	Phe	Try
	E	1,897	C	T	Pro	Ser
	E	1,915	A	T	Asn	Try
	E	1,949	G	C	Arg	Pro
	E	1,954-1,956	TTG	TTTGGG	Leu	Phe-Gly

GenBank Accession number: DENV3 (H87), M93130; DENV4 (H241), S66064.

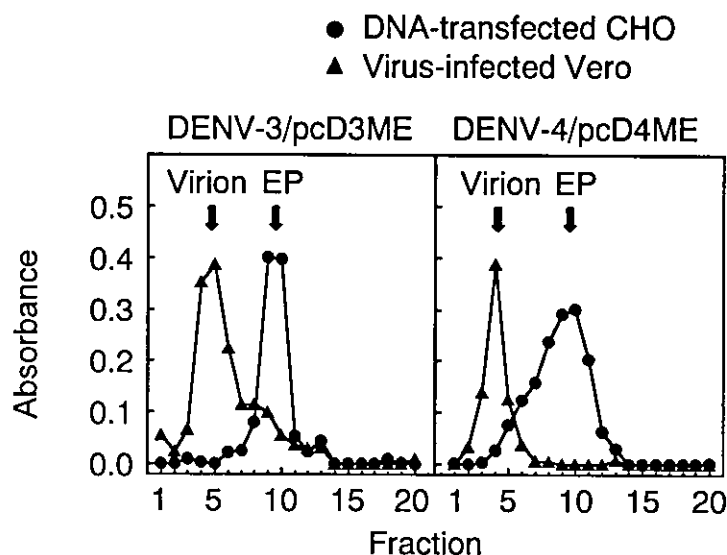


図1. ワクチンプラスミドをトランスフェクトしたCHO細胞の培養液中に含まれるデングウイルスE抗原のショ糖密度勾配遠心による解析(黒丸)。対照として、3型H87株あるいは4型H241株に感染したVero細胞培養液中のE抗原を示した(黒三角)。

表 2. デング 4 価 DNA ワクチンの BALB/c マウスにおける中和抗体誘導能

実験	マウス 匹数	免疫時の週齢 ^a		採血時の 週齢 ^a	中和抗体価 ^b			
		1回目	2回目		D1	D2	D3	D4
1	10	4	7	10	1:10	1:10	1:40	1:10
2	8	4	7	10	1:10	1:40	1:10	1:10
3	5	4	11	16	1:640	1:640	1:1280	1:160

^a 100 μ g の 4 価 DNA ワクチンで 2 回免疫した後、示された週齢時に採血した。

^b 中和試験は 70%フォーカス減少法で行った。

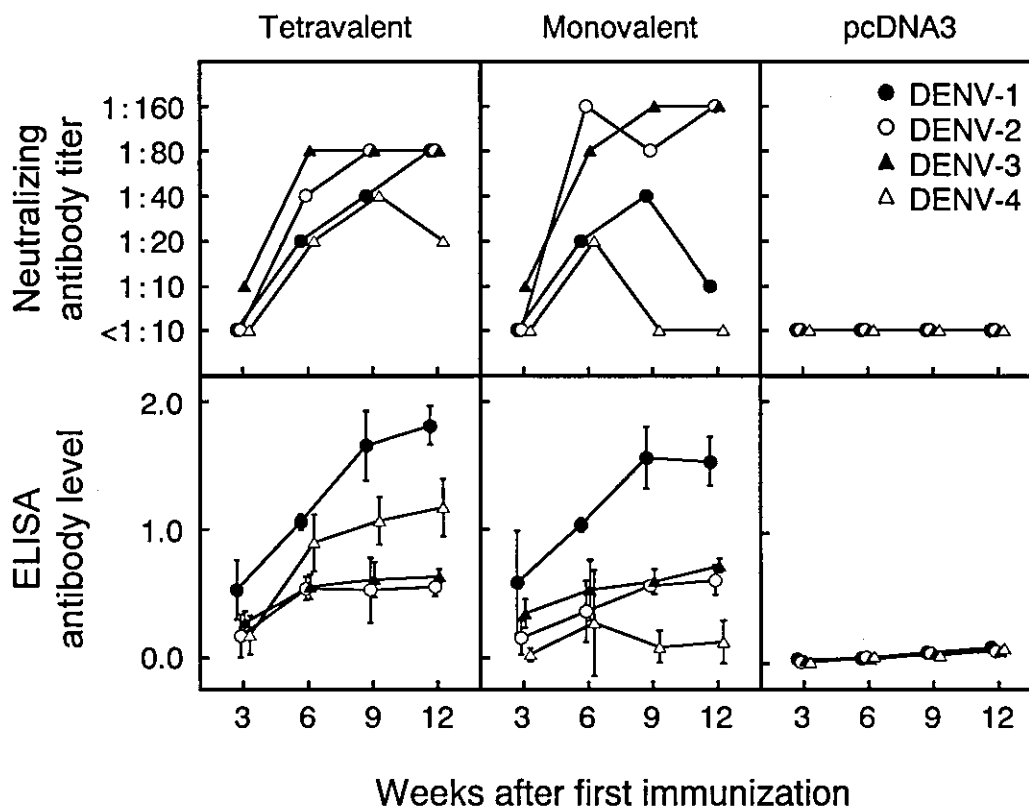


図 2. デング 4 価 DNA ワクチンと単価 DNA ワクチンの抗体誘導能における比較。1 群 6 匹の BALB/c マウスに、100 μ g の 4 価 DNA ワクチン (左)、25 μ g の各単価 DNA ワクチン (中) あるいは 73 μ g の pcDNA3 (右) を 3 週間隔で 2 回接種した。pcDNA3 の量 (73 μ g) は 4 価 DNA ワクチンに含まれる CpG モチーフのモル数と等しくなるよう調整した。同様に、25 μ g の単価 DNA ワクチンには 55 μ g の pcDNA3 を混合した。中和抗体価 (上) はプール血清を用いて求め、また ELISA 抗体値 (下) は個々の血清から得られた値を平均した。誤差棒は、標準偏差を示す。4 価 DNA ワクチン免疫群及び pcDNA3 接種群の血清については、4 つの型に対する抗体レベルを、また単価 DNA ワクチン免疫群の血清についてはワクチンの型と同じ型に対する抗体のレベルを示した。

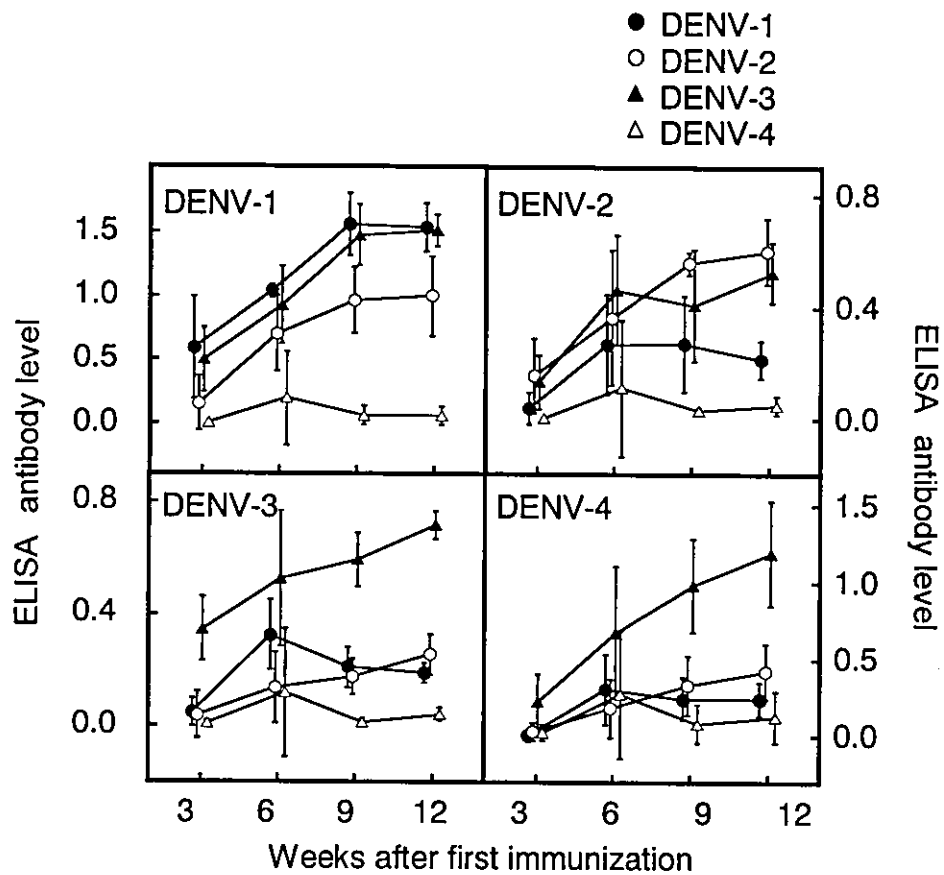


図3. 単価 DNA ワクチンがマウスに誘導した交差性抗体。図2の実験で用いた単価ワクチン免疫マウス血清を用いて、他の型に対する ELISA 抗体値を測定した。すなわち、1型（黒丸）、2型（白丸）、3型（黒三角）あるいは4型（白三角）免疫マウス血清を、1型（左上）、2型（右上）、3型（左下）あるいは4型（右下）抗原に対して ELISA を行った。同じ型に対する抗体値は図2で示した曲線と同じである。各グループ6匹の平均抗体値を標準偏差（誤差棒）とともに示した。

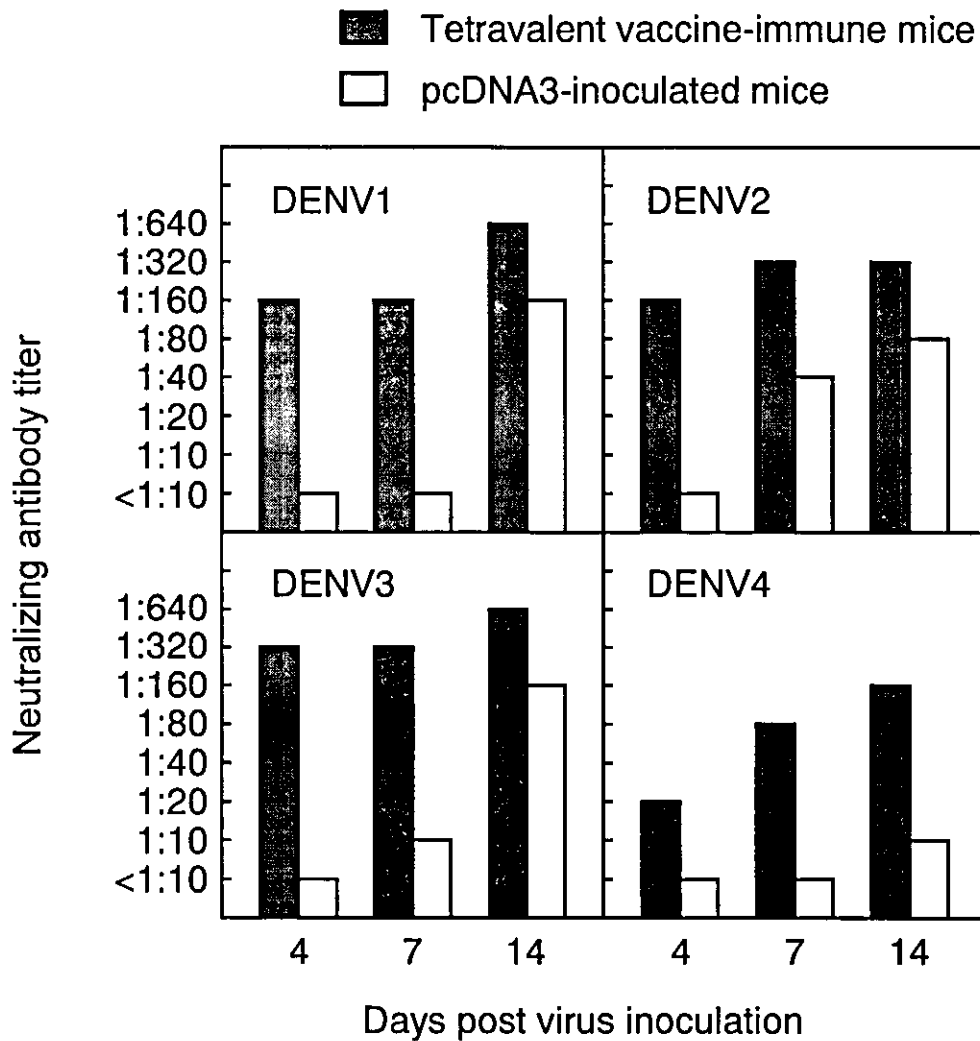


図4. 4価DNAワクチン免疫マウスにおける2次免疫応答。100 μ gの4価DNAワクチンにより3週間隔で2回免疫したマウスに、初回免疫後6週目に 10^7 FFUの1型（左上）、2型（右上）、3型（左下）あるいは4型（右下）ウイルスを腹腔内に接種した。陰性対照としてpcDNA3接種マウスを用い、同様にウイルスを接種した。接種後4、7及び14日目に得られたプール血清を用いて、接種抗原と同型のDENVに対する中和試験を行った。

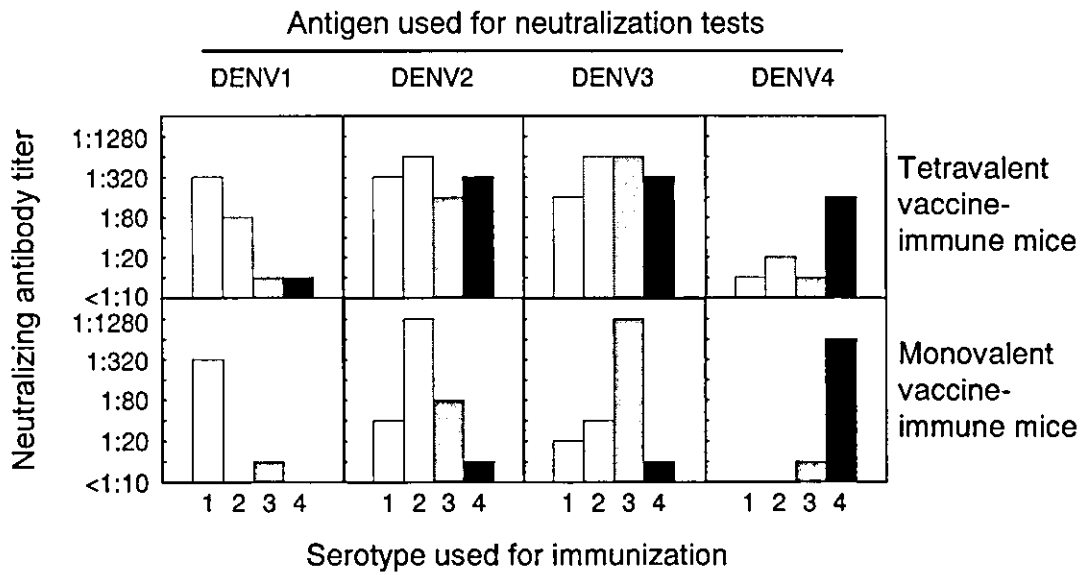


図 5. 4 価ワクチン免疫マウス（上）あるいは単価ワクチン免疫マウス（下）に各血清型のデングウイルスを接種し 14 日目の血清中の中和抗体を測定した。中和試験に用いたウイルスごとに結果をパネルに示した。横軸は接種ウイルスの血清型を示す。4 価ワクチン免疫群のデータは図 4 の 14 日目のプール血清を用いて得られた。

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

デングウイルスに対するモノクローナル抗体可変領域のアミノ酸配列の解析

分担研究者 奴久妻聡一 (神戸市環境保健研究所 微生物部)
協力研究者 小杉紗織、小西英二 (神戸大学 医学部 医療基礎学講座)

研究要旨

デングウイルスは、フラビウイルス科、フラビウイルス属に属する節足動物媒介ウイルスである。デングウイルス1型～4型の感染によって起こるデング熱・デング出血熱は流行地域の拡大と患者数の増加でウイルス感染症の中で最も重要なものと言える。デングウイルスに対する感染防御のメカニズムに関しては未だ明らかにされていないが、デングウイルスに対する中和抗体が主体と考えられている。現在、4つの型それぞれに対して中和抗体を誘導する弱毒デング4価ワクチンの臨床が進んでいるが、最近中和抗体陽性であっても発症するケースが認められた。従って、4価ワクチンの誘導する抗体を解析することはワクチンが実用化される上で極めて重要である。我々は、デングウイルス免疫マウスをモデルとして、RT-PCR法にて抗体の抗原認識部位を含む重鎖可変領域を増幅させ、PCR産物をTAクローニング後、塩基配列を決定しアミノ酸を推定した。

A. 研究目的

デング熱・デング出血熱は熱帯・亜熱帯地域において重要な感染症であるが、今のところ日本国内での感染はない。しかしながら、デングウイルス流行国からの帰国者で輸入感染症としてのデング熱・デング出血熱は認められる。

デング熱・デング出血熱の治療は対症療法が主体で、症状によっては適切な治療を施さないと致死率が高くなる危険性がある。デング熱・デング出血熱の発生数を減少させるために、現在、4つの型それぞれに対して中和抗体を誘導する弱毒デング4価ワクチンの臨床が進んでいる。しかしながら、最近中和抗体陽性であっても発症するケースが認められ問題となっている。事実、デングウイルスに対する感染防御のメカニズムに関しては未だ明らかにされていないが、デングウイルスに対する中和抗体が主体と考えられている。従って、4価ワクチンの誘導する抗体を詳細に解析することはワクチンが実用化される上で極めて重要である。

抗体分子の構造の中で抗原認識部位を含む可変領域は抗体間でアミノ酸配列が異なり、特に抗原と直接接触する相補性決定領域は変異が顕著である。我々は、デングウイルス免疫マウスをモデルとして、複数のプライマーを用いたRT-PCR法にて抗体の重鎖(H鎖)可変領域を増幅させ、PCR産物をTAクローニング後、塩基配列を決定しアミノ酸を推定できるかどうか検討した。

B. 研究方法

1. H鎖可変領域のcDNA合成

神戸大学で作製した31個のハイブリドーマからTRIZOL(GIBCO)を用いてRNAを抽出した。H鎖定常領域に対応するAntisense primerであるMuIgV_H3'-2(表1)を用いてRT反応を行いcDNAを合成した。RT反応は1μgのハイブリドーマ由来RNAを用いて、500nM Antisense primer, 1mM dNTPs, 10mM DTT, 40U RNase inhibitor, 200U SuperScript III RNase H Reverse

Transcriptase (Invitrogen), First strand buffer (Invitrogen)を加え総量 20 μ l とし、GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems) にて 50 $^{\circ}$ C:60min、70 $^{\circ}$ C:15min 反応させ cDNA を合成した。

2. H 鎖可変領域の PCR

H 鎖可変領域の PCR は H 鎖可変領域に隣接する leader peptide に対応する 15 種類の Sense primer (表.1) を混合したもので行った。つまり、PCR は RT 反応液 2 μ l を用いて、200nM Sense primer, 200nM Antisense primer, 200 μ M dNTPs, 2.5U ExTaq polymerase (Takara), PCR buffer (Takara) を加え総量 50 μ l とし、GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems) にて 94 $^{\circ}$ C:1min、60 $^{\circ}$ C:1min、72 $^{\circ}$ C:2min を 40 サイクル繰り返した後、72 $^{\circ}$ C:6min で反応させた。

3. PCR 産物のクローニング

PCR 産物をアガロース電気泳動し可変領域が増幅されたサンプルについてクローニングを行った。つまり、PCR 産物を SUPREC-02 (Takara) を用いて余分な primer と dNTPs を除去した後、TA Cloning Kit (Invitrogen) でライゲーションと Competent cells である INV α F' を用いてトランスフォーメーションを行った。得られた白いコロニーを培養しプラスミドを抽出後、EcoRI で消化することにより増幅された可変領域の DNA 断片の挿入を確認した。

4. 塩基配列の決定とアミノ配列の推定

可変領域の DNA 断片の挿入が確認できたプラスミドについて、3.2pmol の M13 reverse primer と M13 forward (-20) primer (Invitrogen)、BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) を用いて、ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (PE Biosystems) でシーケンスした。得られた塩基配列をもとに BLAST で検索し、アミノ酸配列を推定した。

なお、本研究を実施するにあたり、感染材料や動物を使用しておらず、研究対象者にも何ら不利益が生じなかったことから倫理面での問題はないと判断した。また、遺伝子解析については、ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針を遵守した。

C. 研究結果

1. H 鎖可変領域の RT-PCR

神戸大学で作製した 31 個のハイブリド一から抽出し H 鎖可変領域の RT-PCR を行いアガロースゲル電気泳動したところ、15 種類の Sense primer を混合したものでバンドが検出できたのは 19 個 (61%) であった。また、検出されたバンドの中には高分子量の薄いバンドも見られたが、分子量が約 500bp の強いバンドが主に認められた (図 1)。

2. H 鎖可変領域の塩基配列

H 鎖可変領域を含むバンドが検出できた 19 個中 7 個 (Deng 1 型 2 クローン: III-10A10, III-10G6、2 型が 3 クローン: III-1B6, V-4B3, IX-1E4、3 型が 2 クローン: II-12F10, III-9B12) について、TA クローニングを実施し塩基配列を決定した。すべてにクローンの 5' 末端と 3' 末端の各々で Sense primer と Antisense primer の塩基配列が確認された。さらに、得られた塩基配列を BLAST で検索したところ、すべてのクローンで IgG H 鎖の塩基配列と相同性を示したことから、クローニングした PCR 産物は H 鎖可変領域を含む DNA 断片であることが明らかになった。

3. H 鎖可変領域のアミノ配列

得られた塩基配列を BLAST の Translations で検索し、一致するアミノ酸配列を探索した。さらに、Sense primer と Antisense primer の塩基配列の中に ORF を指定する triplet が示されていたので、これをもとにしてフレームをチェックし、アミノ酸配列を推定した。その結果、クローニングした DNA 断片のアミノ酸配列は H 鎖可変領域に隣接する leader peptide に対応する領域 (L)、可変領域 (V)、Diversity 領域 (D)、Joining chain 領域 (J) および定常領域 (C) から構成されていた。この中で、L のみが翻訳後除かれ、可変領域は V 領域 (aa: 1~102)、D 領域 (aa: 103~110)、J 領域 (aa: 111~124) から翻訳された部分に相当すると考えられた (図 2)。従って、今回のクローニングによって H 鎖可変領域の full-length が得られたことになる。本研究で解析された 7 クロー

ンのアミノ酸を CLUSTAL W multiple sequence alignment (DDBJ)にて比較したところ、可変領域はいくつかの共通配列(LEWや YYCAR)も存在したものの、抗体間でアミノ酸配列がかなり異なっていた(図2)。

D. 考察

デング熱・デング出血熱は今のところ日本国内での感染は報告されていないが、近年毎年のようにデングウイルス流行国からの帰国者で輸入感染症としてのデング熱・デング出血熱は認められ問題となっている。

一方、熱帯・亜熱帯地域においてデング熱・デング出血熱は深刻な社会問題となっていることから、ワクチン接種による予防対策が強く求められている。現在、4つの型それぞれに対して中和抗体を誘導する弱毒デング4価ワクチンの臨床が進んでいるが、最近中和抗体陽性であっても発症するケースが認められ問題となっている。デングウイルスに対する感染防御がウイルスに対する中和抗体が主体と考えられることから、4価ワクチンの誘導する抗体を詳細に解析することはワクチンが実用化に際して多くの情報を提供できるものと考えている。本研究において、デングウイルス免疫マウスをモデルとして、複数のプライマーを用いた RT-PCR 法にて抗体の H 鎖可変領域を増幅させることに成功し、PCR 産物を TA クローニングすることで H 鎖可変領域の full-length のアミノ酸配列の解析が可能になった。なお、増幅させることができなかったクローンについてはプライマーを分けて RT-PCR を行う必要があると思われる。さらに、解析するクローンの数を増やして、抗体活性と可変領域のアミノ酸配列の相同性を調べるのが今後の課題と考えられるが、多くの情報が蓄積すれば、中和抗体陽性であっても発症するケースの解明のみならず、デング熱・デング出血熱の発症メカニズムの解明にも貢献できるものと考えている。

E. 結論

4 価ワクチンの誘導する抗体を詳細に解析するための実験系の一つとして、デングウイルス免疫マウスをモデルとして、複数のプライマーを用いた RT-PCR 法にて抗体の H 鎖可変領域を増幅させることに成功した。さらに、PCR 産物を TA クローニングすることにより、H 鎖可変領域の full-length のアミノ酸配列の解析が可能になった。この方法は H 鎖可変領域の解析の有用であると考えられた。

F. 研究発表

1. 学会発表

小杉紗織、奴久妻聡一、小西英二、デング2型ウイルスがマウスに誘導する抗体のクローナルレベルにおける解析：抗体可変領域の推定アミノ酸配列における個体差 第39回日本脳炎ウイルス生態学研究会。(神戸) 6月、2004年

竹上勉、村上学、奴久妻聡一、日本脳炎ウイルスゲノム RNA3'末端 UTR の生物学的役割：持続感染との関わり 第52回日本ウイルス学会。(横浜) 11月、2004年

村上学、奴久妻聡一、竹上勉、RNAiによる日本脳炎ウイルス感染増殖の制御 第52回日本ウイルス学会。(横浜) 11月、2004年

表1. 抗体H鎖可変領域のRT-PCRのプライマー

Sense primers (15)

MuIgVH5'-A	5'-GGGAATTCATGRASSTSKGGYTMARCTKGRITTT-3'
MuIgVH5'-B	5'-GGGAATTCATGRAATGSASCTGGGTYWTYCTCTT-3'
MuIgVH5'-C-1	5'-ACTAGTCGACATGGACTCCAGGCTCAATTTAGTTTTCT-3'
MuIgVH5'-C-2	5'-ACTAGTCGACATGGCTGTCYTRGBGCTGYTCYTCTG-3'
MuIgVH5'-C-3	5'-ACTAGTCGACATGGVTTGGSTGTGGAMCTTGCAATTCCT-3'
MuIgVH5'-D-1	5'-ACTAGTCGACATGAAATGCAGCTGGRTYATSTTCTT-3'
MuIgVH5'-D-2	5'-ACTAGTCGACATGRCAGRCTTACWYYTCATTCCT-3'
MuIgVH5'-D-3	5'-ACTAGTCGACATGATGGTGTTAAGTCTTCTGTACCT-3'
MuIgVH5'-E-1	5'-ACTAGTCGACATGGGATGGAGCTRTATCATSYTCTT-3'
MuIgVH5'-E-2	5'-ACTAGTCGACATGAAGWTGTGGBTRAACCTGGRT-3'
MuIgVH5'-E-3	5'-ACTAGTCGACATGGRATGGASCKKIRTCTTTMTCT-3'
MuIgVH5'-F-1	5'-ACTAGTCGACATGAACTTYGGGYTSAGMTTGRTTT-3'
MuIgVH5'-F-2	5'-ACTAGTCGACATGTACTTGGGACTGAGCTGTGTAT-3'
MuIgVH5'-F-3	5'-ACTAGTCGACATGAGAGTGCTGATTCTTTTGTG-3'
MuIgVH5'-F-4	5'-ACTAGTCGACATGGATTTTGGGCTGATTTTTTTTATTG-3'

Antisense primer (1)

MuIgVH3'-2	5'-CCCAAGCTTCCAGGGRCCARKGGATARACIGRTGG-3'
------------	---

I= inosine R= A or G W= A or T Y= C or T D= A or G or T K= G or T
H= A or C or T S= C or G V= A or C or G M= A or C B= C or G or T □: ORF

図1. デングウイルスに対するモノクローナル抗体可変領域のRT-PCR



M: Φ X174-Hae III marker

*: 陽性クローン

可変領域のPCR産物は分子量が約500bpのバンドとして検出された。

```

1
V-4B3      GVHSQVQLQQSAAELARPGASMKMSCKASGYTI TNYTMHWVKQRPGGGLWIGYINPSSG
III-9B12   GVHSQVQLQQSGPQLVRPGASVKI SCKASGYSFTSYWYVVKQRPGGGLWIGMIDPSSD
III-10G6   GVLSEVQLQQSGPELVKPGASVKI SCKTSGYTFTEYTMHWVKQSHGKSLEWIGGINPNNG
III-1B6    GVNSEVQLQQSGTELKPGASVKLSCTASGFNI KDTYMHVVKQRPEQGLEWIGRIDPANA
IX-1E4     GVQCDVQLVESGGGLVQPGGSRKLSCAASGFTFSSFGMHVVRQAPEKGLEWVAYI SSGSS
II-12F10   GVQCEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFSTYAMSWVRQTPEKRLWVATI SSGRS
III-10A10  CVLSQVQLKESGPGLVAPSQSLSI TCTVSGFSLTSSGVHVRQPPGKLEWLGVWAG-G
          * . : *** : * . * . * . : : * . ** : . : . : : ** : * : *** : . * . .
                                     103      111

V-4B3      YTEYNQKFKDKTTLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCAR—ENYGSRYFDVWGAGTT
III-9B12   ETRLIKFKDKATLTVDKSSSTAYMQLSSPTSEDSAVYYCARS—EGWLLYALDYWGQGT
III-10G6   GTTYNQKFKGKATLTVDKSSSTAYMELRSLTSEDSAVYYCAR————EFFRYWGQGT
III-1B6    NTKYDPNFQGGKATITADTSFNAYLQFSSLTPEDTAVYYCAK——TGSYWYFDVWGAGTT
IX-1E4     TIYYADTVKGRFTIYSDNPKNTLFLQMTSLRSEDAMYYCARS—ITYDYFFDYWGQGT
II-12F10   YTFYPD—KGRFTISRDNASTLYLQMSLRSLEDAMYYCARH—GEYGNFWFAYWGQGT
III-10A10  STNYNSALMSRLSISKDNKSQVFLKMNSLQTDAMYYCAREGRLPLYYAMDYWGHTS
          . : : : * . . . : : : * . : : * : * : * : * : * : : * * * *
                                     124

V-4B3      VTVSS
III-9B12   VTVSS
III-10G6   VTVS-
III-1B6    VTVSS
IX-1E4     LTVSS
II-12F10   VTVSA
III-10A10  VTVS-
          : ***

```

図2. H鎖可変領域のアミノ配列の比較 (CLUSTAL W multiple sequence alignment)
 可変領域はV領域 (aa: 1~102)、D領域 (aa: 103~110)、J領域 (aa: 111~124) に相当する。
 デングウイルス1型: III-10A10, III-10G6
 デングウイルス2型: III-1B6, V-4B3, IX-1E4
 デングウイルス3型: II-12F10, III-9B12

分担研究報告書

ウエストナイルウイルス DNA ワクチンの作製と免疫原性に関する検討

分担研究者 只野昌之（琉球大学大学院医学研究科助教授）

研究要旨：ウエストナイル（西ナイル）ウイルスのウイルス粒子構成蛋白質 prM および E 蛋白質を発現する DNA ワクチン候補 pCMV (WN/prM-E) を作製した。1 回に 50 ないし 10 マイクログラムの pCMV (WN/prM-E) をマウスに少なくとも 1 回皮下接種すれば、特異的な抗体が産生された。10 マイクログラムの DNA ワクチン候補を 4 回皮下接種したマウスでは 50LD₅₀ の西ナイルウイルス NY 株の脳内接種から完全に守られた。DNA ワクチン候補の免疫原性を増強し、十分な免疫応答に必要な DNA 量を減じる目的で用いられた金コロイドは 50 マイクログラムの DNA 量では免疫増強効果を認めたが、2 マイクログラムあるいは 0.4 マイクログラムのドースでは効果がなかった。

A. 研究の目的

西ナイルウイルスに対する DNA ワクチン候補を作製し、発現蛋白の生化学的・抗原性状を解析するとともに、免疫原性、免疫補助剤についても検討する。

B. 研究方法

DNA ワクチン候補の構築：西ナイルウイルス (NY 株) 遺伝子 RNA を鋳型として調製した prM-E 蛋白質領域 cDNA を哺乳動物発現ベクター pCMV の CMV プロモーター下流に挿入し、西ナイルウイルス DNA ワクチン候補 pCMV (WN/prM-E) とした (図-1)。遺伝子導入細胞における DNA ワクチン候補発現蛋白の解析：pCMV (WN/prM-E) をハ

ムスター腎由来 BHK-21 細胞株に遺伝子導入し、24 時間後にアルコール固定し、発現の有無を確認した。

遺伝子導入した BHK-21 細胞および、その培養液について発現蛋白の分子量をウェスタンブロット法で解析した。

DNA ワクチン候補接種マウスにおける免疫応答の検討：種々の量の pCMV (WN/prM-E) をマウスの皮下に 2 週間毎に接種し、血中特異抗体を測定した。

金コロイド、ポリマー系遺伝子導入試薬を補助剤として pCMV (WN/prM-E) でマウスを免疫した時の免疫増強効果を検討した。

C. 研究結果

抗フラビウイルスウサギ抗体を1次抗体とした間接免疫染色で pCMV (WN/prM-E) を遺伝子導入した BHK-21 細胞の細胞質内に特異抗原の発現が認められた (図-2)。pCMV (WN/prM-E) を遺伝子導入した BHK-21 細胞の細胞溶解液および培養液のウエスタンブロッティング法による解析で、いずれのサンプルにおいても感染細胞にみられる prM および E 蛋白質の移動度に一致する2種類の蛋白質が検出された (図-3)。

種々の濃度で pCMV (WN/prM-E) を2週毎に7-8週齢の Balb/c マウス (雌) に皮下接種し、液性免疫応答を調べたところ、接種した DNA の量に応じた抗体価で免疫応答が確認された (図-4 および 5)。1回あたり50マイクログラムの DNA を接種されたマウス群では、1度の接種で特異抗体がすべてのマウスに誘導され、免疫を重ねる毎に抗体価が上昇した (図-4)。

また、同様の傾向が、10マイクログラムの DNA を接種したマウス群でも認められたが、50マイクログラムを接種した群よりは免疫応答が低かった。さらに、接種量を減らすと免疫応答が弱くなった。1回あたり2マイクログラムのドースで免疫したマウス群の一部では抗体産生が誘導されず、たとえ抗体が産生されても抗体価が低かった。0.4マイクログラムにドースを減らすと、もはや抗体は検出されなかった (図-5)。

そこで、pCMV (WN/prM-E) のマウス皮下接種における液性免疫応答を増強する目的で金コロ

イドあるいはポリマー系遺伝子導入試薬を pCMV (WN/prM-E) と混合してマウス皮下接種実験を試みたところ、50マイクログラムの pCMV (WN/prM-E) と金コロイドの組み合わせでは免疫増強が認められたが (図-7)、2あるいは0.4マイクログラムの DNA と金コロイドの組み合わせでは全く効果が認められなかった (data not shown)。

次に、ポリマー系遺伝子導入試薬と pCMV (WN/prM-E) を混合してマウスに皮下接種し、免疫増強効果を検討したが、どのドースでも効果が認められなかった (data not shown)。

10から0.4マイクログラムのドースで2週間毎に4回皮下接種したマウス群に、最終免疫から2週間後に50LD₅₀の西ナイルウイルス NY 株を脳内接種し、生死を4週間観察した (図-6)。

10マイクログラムのドースで免疫されたマウスは完全に防御されたが、2マイクログラムのドースでは部分的効果しか認められなかった。さらに0.4マイクログラムにドースを減らしたマウス群では全く効果が認められなかった。

D. 考察

我々が作製した哺乳動物細胞で西ナイルウイルスの prM および E 蛋白質を発現する pCMV (WN/prM-E) は、マウスへの皮下接種で致死的な西ナイルウイルス脳内接種から防御できる能力を持っている事が確認された。しかし、防御効果を増強し、防御に必要なドースを減らす為に用いら