

れた金コロイドは高いドースでは増強効果が認められるものの、低いドースでは役に立たなかった。さらに、ポリマー系遺伝子導入試薬は高いドースでも増強効果が認められなかった。今後、ウイルス様粒子にプラスミドベクターを封入して遺伝子導入効率を高める方法を取り入れ、経口からの DNA ワクチン接種を試みる予定である。

E. 結論

本研究で作製された pCMV(WN/prM-E)は西ナイルウイルス DNA ワクチン候補として十分なマウス免疫原性を有していた。金コロイドは DNA ワクチンの摂取量を減らす為の免疫増強剤としては働かなかった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

Tafuku, S., Tadano 他 Protective effects of DNA vaccine encoding West Nile virus prM-E glycoproteins in mice.

Fortieth Anniversary United States-Japan Cooperative Medical Science Program, Kyoto, Japan, December 7-10, 2004.

田福宣治, 新垣 榮, 新川 武, 只野昌之, 森 直樹: 金コロイドを用いたウエストナイルウイルスDNAワクチンの効果. 第52回日本ウイルス学会学術集会, 横浜, 2004年11月21日-23日.

H. 知的財産権の出願/登録状況 (予定を含む)
なし

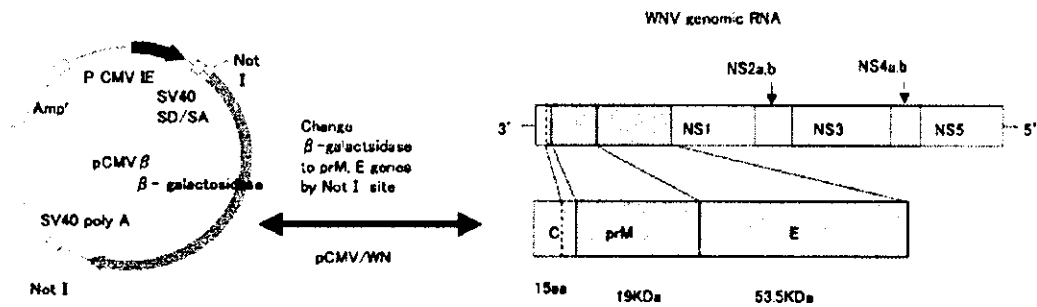
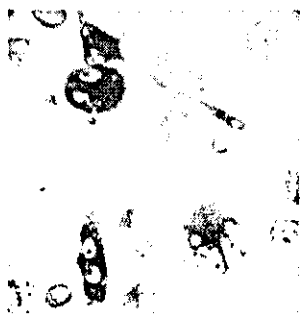


図- 1. 西ナイルウイルス DNA ワクチン候補の構築



pCMV(WN/prM-E)導入細胞



pCMV β (空ベクター) 導入細胞

図- 2. BHK-21 細胞における西ナイルウイルス DNA ワクチン候補の発現

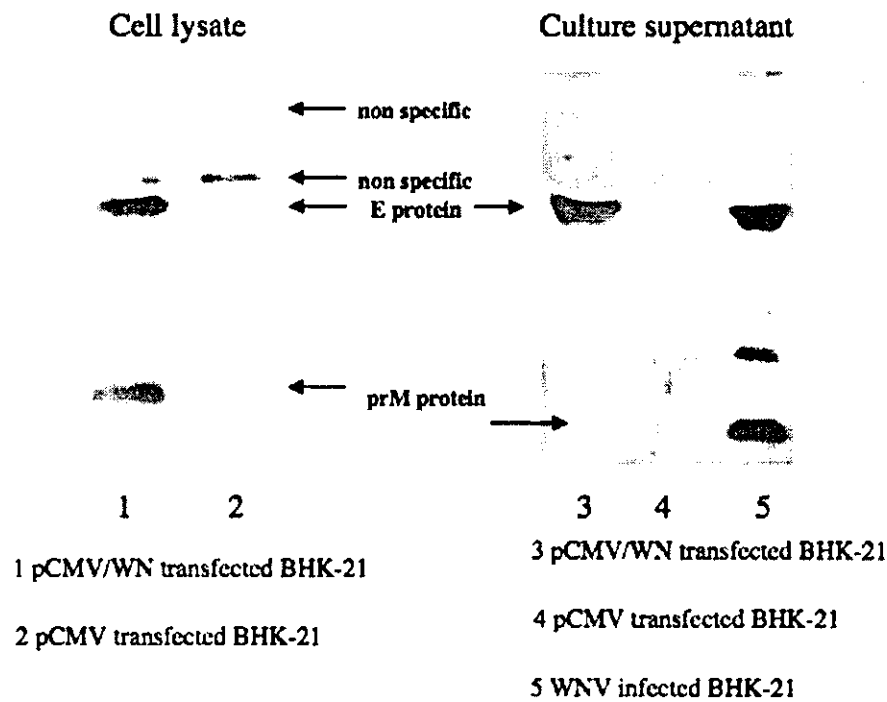


図- 3. ウェスタンブロッティングによる WNV-DNA ワクチン候補発現蛋白の解析

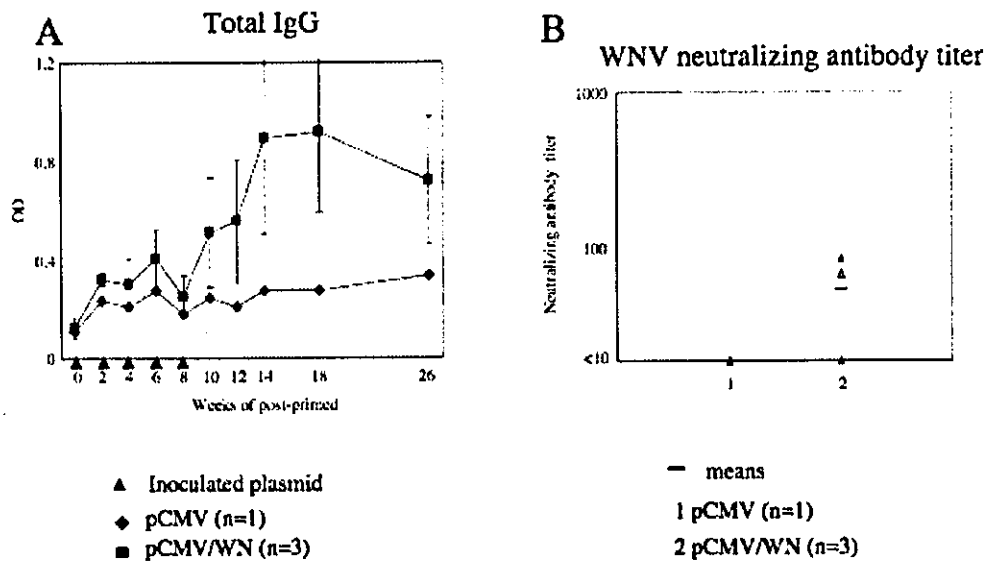


図- 4. 西ナイルウイルス DNA ワクチン候補接種マウスの免疫応答

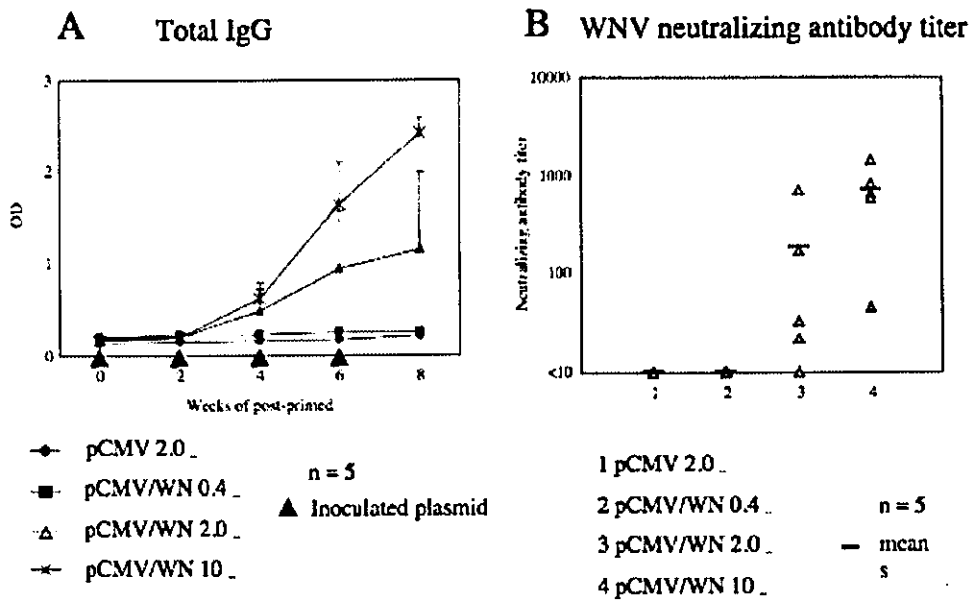


図- 5. Dose-dependent induction of anti-WNV antibodies in BALB/c mice

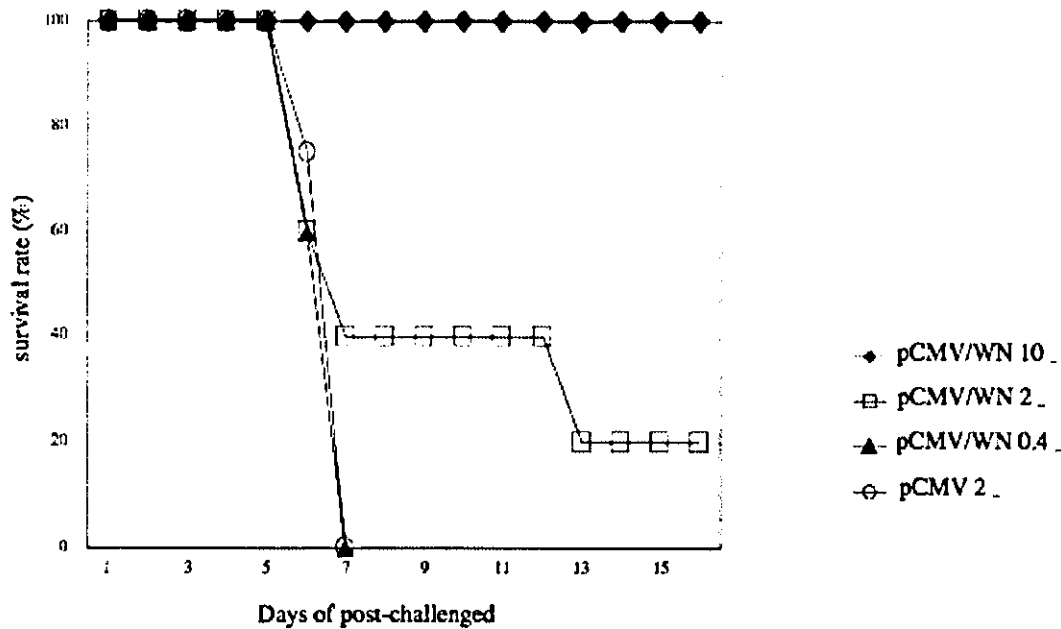


Fig- 6. Protection test of pCMV/WN immunized BALB/c mice challenged i.c with 50 LD₅₀ of WNV

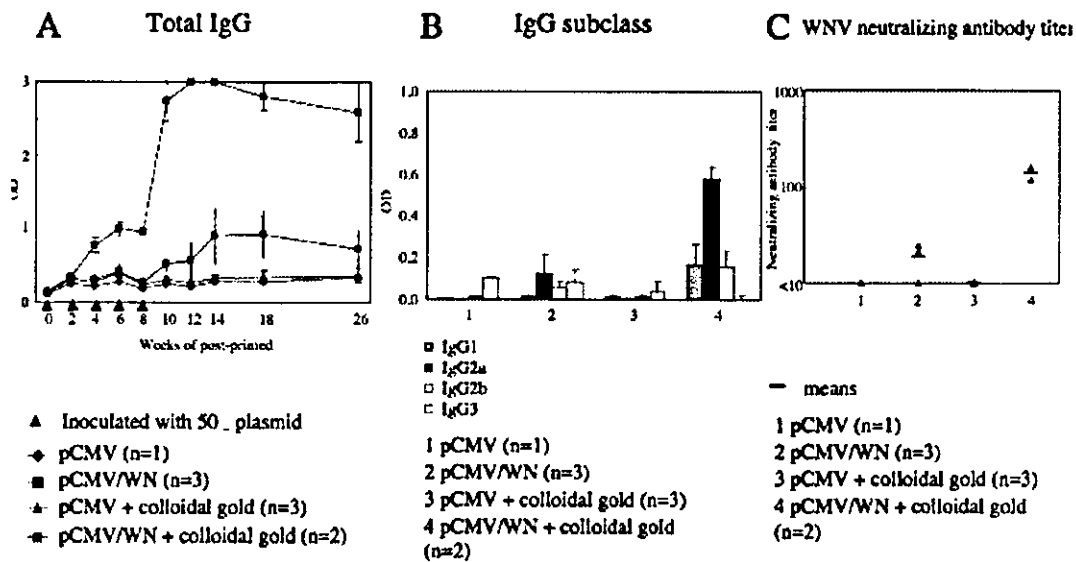


Fig- 7. Colloidal gold enhanced immune responses of mice

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

ウエストナイルウイルスのリバースジェネティックス法の確立
（問題点と今後の課題）

分担研究者	前田秋彦（北海道大学大学院獣医学研究科）
協力研究者	前田潤子（北海道大学大学院獣医学研究科）
	高木弘隆（国立感染症研究所バイオセーフティー管理室）
	倉根一郎（国立感染症研究所ウイルス第一部）
	荻野倫子（北海道大学大学院獣医学研究科）
	堀内基広（北海道大学大学院獣医学研究科）

研究要旨

ウイルスのリバースジェネティックス法はウイルスの生物学的解析ばかりでなく、新規ワクチン開発の強力なツールとして応用されつつある。本年度、私達はウエストナイルウイルス（WNV）のリバースジェネティックスを確立するために、WNVのゲノムRNAより、ウイルスの複製に関与しない構造蛋白質の遺伝子を取り除いた残りの部分のcDNAを合成し、これをWNVのレプリコンとして利用することを試みた。レプリコンRNAの合成は、1) プラスミドに組み込んだレプリコンcDNAから合成する方法と、2) PCR増幅したレプリコンcDNAを直接使用して合成する方法について検討した。現段階ではレプリコンのcDNAをプラスミドに組み込むことが困難であるため、PCR増幅したレプリコンのcDNAを用いてレプリコンRNAを合成する方法の方が技術的に実現可能であるものと考えられた。

A. 研究目的

近年、各種ウイルスのリバースジェネティックス法が確立され、これを利用して、ウイルスの生物学的、病原学的解析が行われている。また、新規ワクチンの開発においても、リバースジェネティックス法が応用されつつある。本法の利点は、ウイルスのゲノム上の目的部位に比較的容易に変異を導入出来ることであり、変異部位の明らかな弱毒ウイルスの作製が可能であるものと考えられる。

ウエストナイルウイルス（WNV）のワクチネーションは不活化ウイルスを用いてウマで行われている。しかし、ヒトにおけるWNVに対するワクチンは、様々な国の研究機関で開発途中であり、安全で有効なワクチンの開発が急務である。

そこで、本課題研究において、私達はWNVのリバースジェネティックス法を確立し、WNVに対するワクチン開発へ応用することを目的とした。

B. 研究方法

WNVレプリコンを作製する方法として、1) レプリコンを含むプラスミドを構築し、これを鋳型としてレプリコンRNAを合成する方法と、2) PCRで完全長のレプリコンcDNAを合成し、これを直接、鋳型としてレプリコンRNAを合成する方法について検討した。

1) レプリコンを含むプラスミドの構築
図1に、今回行ったWNV遺伝子のクローニングの概略を示す。約11kbのWNVのゲノムRNAから、それぞれがオーバーラ

ップし、ゲノム RNA の全長をカバーする 4 つの cDNA 断片を PCR により合成し、これらをプラスミド DNA に組み込んだ (pCR II 5' /3'、pUC19 SPs、pUC18 E/2B および pUC19 (Δ HindIII) 2B/4B)。それぞれの重なり合う部分に存在する適当な制限酵素部位を利用して目的とする完全長のレプリコンを含むプラスミド DNA を構築することを試みた。各種のプラスミド (pBR322, pUC18, pUC19, pGEM3Z, pBluescript^RII SK(-), pMW119 等)、宿主 *E. coli*. (DH5 α , XL-1 Blue, TOP10F', JM109, HB101, Stb12 等)、培養条件 (温度、時間、抗生物質の濃度等) 等について検討した。

2) PCR による完全長の WNV のゲノム RNA の cDNA 合成

1) で作製した WNV の cDNA 断片を用いて、完全長の WNV のゲノムとレプリコン RNA の cDNA を合成した (図 1)。概略を図 2 に示す。

C. 研究結果

1) レプリコンを含むプラスミドの構築

図 2 に示す、ゲノム RNA の全長をカバーする 4 つの cDNA 断片を組み込んだプラスミドが得られた。しかし、方法に示す各種のプラスミド、宿主および培養条件について検討したが、WNV の完全長のレプリコンが組み込まれたプラスミドを構築出来なかった。

2) PCR による完全長 WNV ゲノムとレプリコン RNA の cDNA の合成

1) で得た、WNV ゲノム RNA の 4 つの cDNA 断片を鋳型として、WNV のゲノム RNA の全長をカバーする様に PCR をデザインしたところ、全長の WNV ゲノムとレプリコン RNA の cDNA を得る事が出来た (図 3)。

D. 考察

本研究において、WNV の完全長のレプリコンを含むプラスミドが得られなかった理由は、(1) WNV の遺伝子が、*E. coli*. の

なし

3. その他

なし

増殖に対して毒性がある、(2) 使用したプラスミドと宿主 *E. coli*. の相性が悪い、

(3) 技術的な問題がある等が考えられる。しかし、一般的にフラビウイルス科のウイルスでは cDNA クローニングの作製が難しいとされているため、WNV の遺伝子が、*E. coli*. の増殖に対して毒性があるものと考えられる。実際に本研究では WNV の E/NS1/NS2A/NS2B の cDNA 断片をサブクローニングにより、他のプラスミドに組み込むことが出来なかった。(2) や (3) については、技術的に改善出来るため、今後、更に検討する必要がある。

私達は、PCR を用いた完全長の WNV ゲノム RNA の cDNA を合成出来た (図 3)。したがって、WNV のレプリコン RNA を合成する場合においても、PCR 法により、レプリコンの cDNA を合成することが出来るものと考えられる。そこで、今現在、PCR を基に、WNV レプリコンの合成を検討している。

E. 結論

本研究結果より、現段階では PCR を基として WNV のレプリコンを作製する方法が、レプリコンの cDNA を組み込んだプラスミドから作製する方法よりも技術的に応用し易いものと考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録

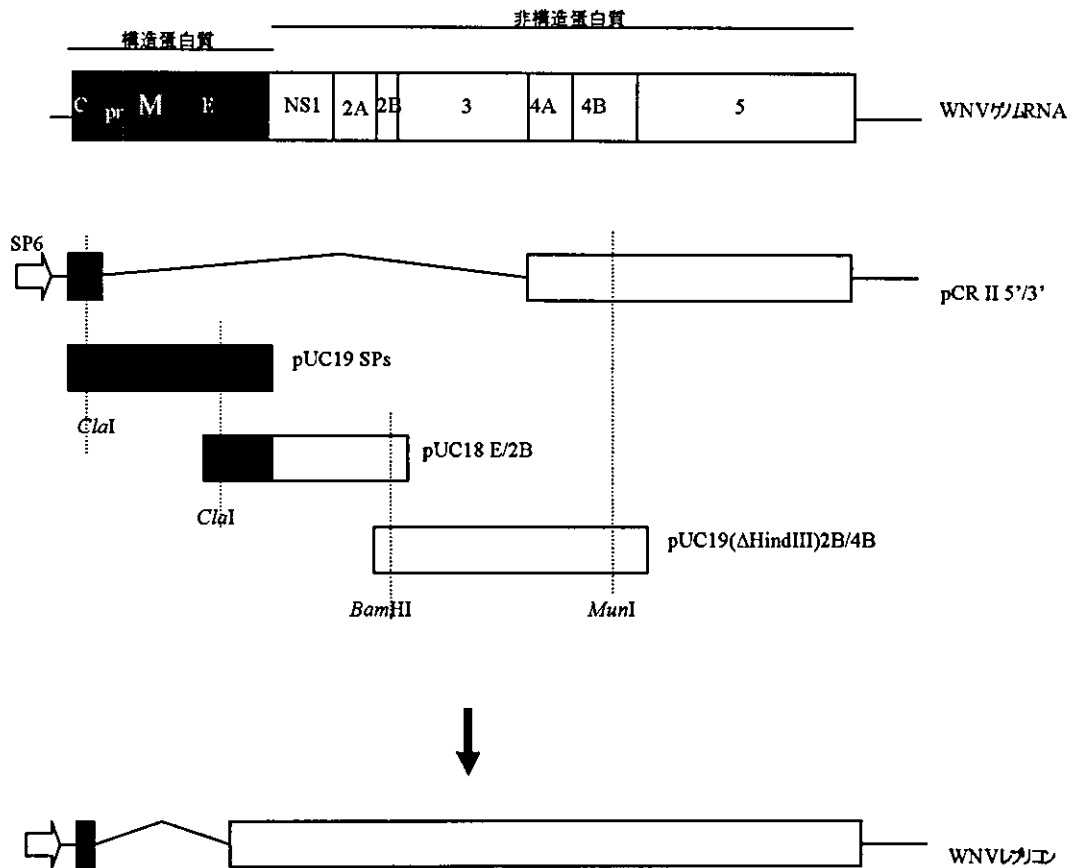


図1. WNVのレプリコン（プラスミドを基とする）作製の概略図

WNVのゲノムRNAを鋳型として、それぞれが部分的に重なるcDNAを合成し、図に示すプラスミドに組み込んだ(pCRII 5' /3' , pUC18 E/2B および pUC19(ΔHindIII)2B/4B)。それぞれのプラスミドを図に示す制限酵素 (*Cla*I、*Bam*HI および *Mun*I) で切断し、ライゲートすることにより WNV レプリコンを含むプラスミドの作製を試みた。

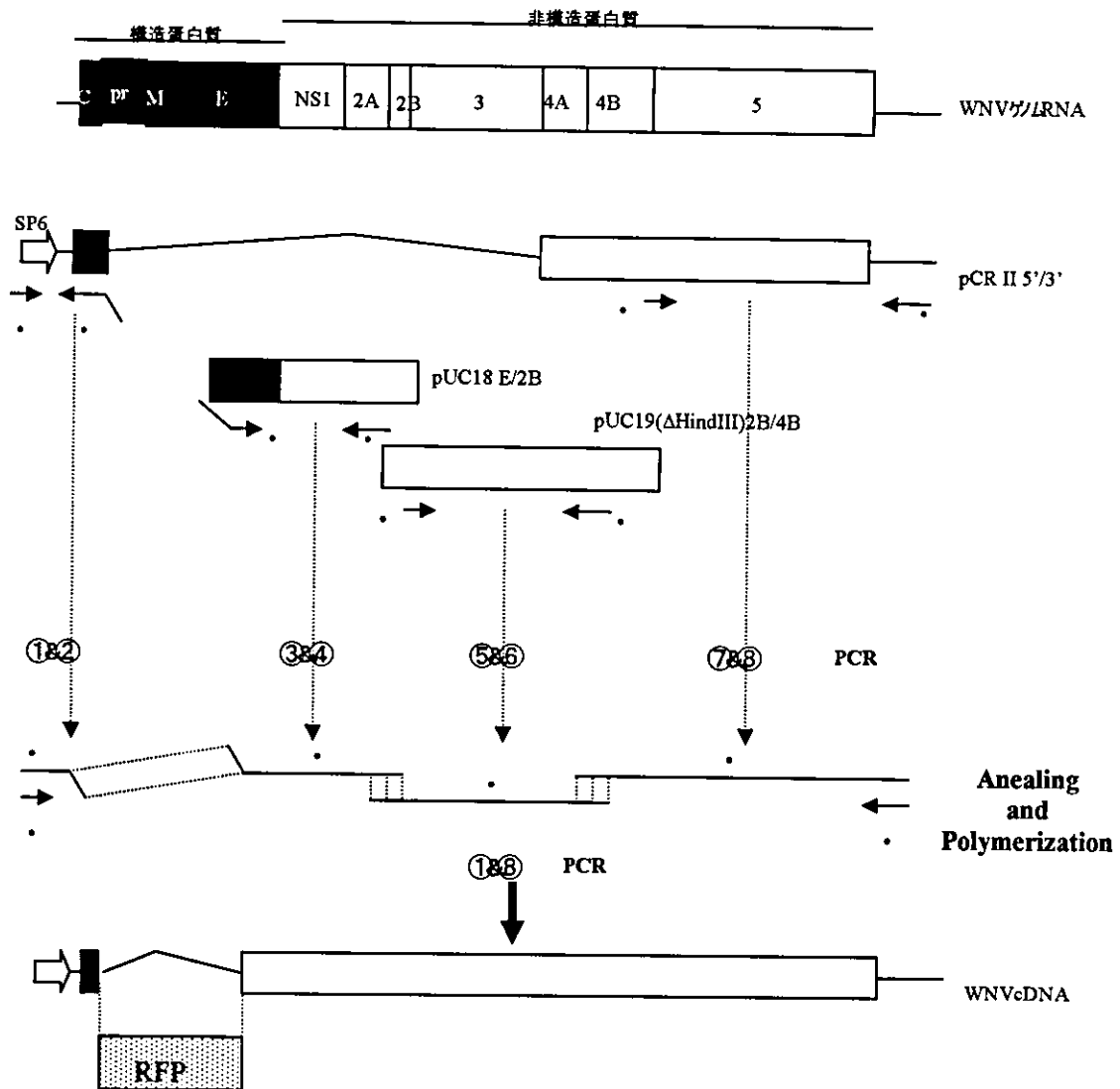


図2. WNVのレプリコン（PCRを基とする）作製の概略図

WNVのゲノムRNAを鋳型として、それぞれが部分的に重なるcDNAを合成し、図に示すプラスミドに組み込んだ（図1）。pCRII 5' /3'，pUC18 E/2B および pUC19(ΔHindIII)2B/4B)を鋳型として、それぞれ①と②および⑦と⑧、③と④、⑤と⑥のプライマーを用いてPCRを行う。得られたPCR産物（それぞれI，IV，II，およびIII）を混合してそれぞれのPCR断片をアニーリングしDNAポリメラーゼにより二本鎖にする。次に、①と⑧のプライマーを用いてPCRを行い、完全長のWNVレプリコンcDNAを作製する。レプリコンにはマーカーとして赤色蛍光色素（RFP）を組み込んだ。

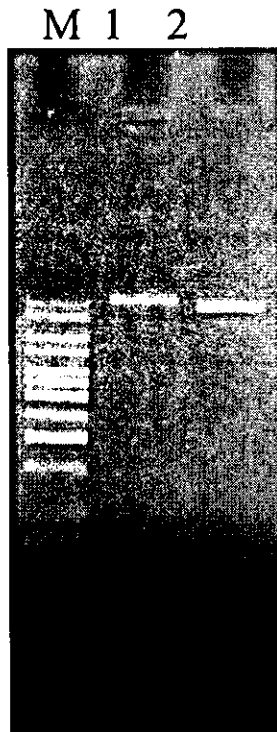


図3. PCRによるWNVゲノムRNAのcDNAの増幅

図2の方法を用いてWNVゲノムRNAのcDNAを合成した。M: 1 kbp DNA マーカー、レーン1および2は、それぞれPCRにより増幅したWNVゲノムRNAとRFPを組み込んだレプリコンのcDNA (矢印) を0.8%アガロースゲルで展開した結果を示す。

分担研究報告書

無血清培養 Vero E6 細胞でのウエストナイルウイルスの増殖に関する研究

分担研究者 前田秋彦（北海道大学大学院獣医学研究科）
協力研究者 前田潤子（北海道大学大学院獣医学研究科）
高木弘隆（国立感染症研究所バイオセーフティー管理室）
倉根一郎（国立感染症研究所ウイルス第一部）
荻野倫子（北海道大学大学院獣医学研究科）
堀内基広（北海道大学大学院獣医学研究科）

研究要旨

培養細胞系を用いたワクチンの製造において無血清培地を用いると、血清成分を含まないため、より安全なワクチンの製造が可能であると考えられる。そこで本研究では、無血清培地に馴化させた Vero E6 細胞 (E6/SFM) を用いて、ウエストナイルウイルス (WNV) の増殖を検討した。10%牛胎仔血清 (FCS) を含む培地 (E6) を用いて WNV を産生した場合、WNV の産生は3日目にピーク ($\sim 2 \times 10^9$ Plaque forming units (P. f. u. /mL)) に達した。一方、E6/SFM 細胞に WNV を感染させると、2日目にピーク ($\sim 2 \times 10^{10}$ P. f. u. /mL) に達した。また、E6 細胞の WNV 感染で認められた細胞変性効果 (CPE) は、E6/SFM 細胞への感染では認められなかった。しかし、感染後の急激な pH の減少に伴って、E6/SFM の生細胞数は急激に減少していた。本結果は、E6/SFM 細胞を用いて、高力価で純度の高い WNV の抗原を精製可能性であると考えられる。

A. 研究目的

近年、牛海綿状脳症の発生により、各種生物由来の製剤についての安全性が危惧されている。細胞培養を利用したワクチンの開発においても、牛血清を添加した培養液を用いてウイルスのワクチン株を製造しているため、その安全性が問題となっている。

無血清培養細胞を用いたウイルス増殖系を確立することは、培養条件による実験誤差を最小限に出来るばかりでなく、血清由来の蛋白質が培養液に存在しないことから、ウイルスの精製が容易であり、高純度のウイルス抗原の精製が可能である。

そこで、本研究では牛血清を添加しな

いで培養することが出来る、無血清培地 (SFM) に Vero E6 細胞を馴化させることによって、WNV の無血清細胞培養増殖系を確立することを目的とした。

B. 研究方法

E6 細胞を SFM (VP-SFM AGT, 12559, GIBCO) で3ヵ月以上培養し、SFM に馴化させた (E6/SFM)。E6/SFM 細胞に WNV の Eg101 株を感染させ、感染に伴う細胞変性効果 (CPE) を異相差顕微鏡下で観察した。また、ウイルス蛋白質の合成をウエスタンブロット法で検討した。培養上清中のウイルス力価の経時的な変化は、プラークアッセイ法で測定した。生細胞数の指標としてテトラゾリウム化合物の還元

(CellTiter96A_{QUEOUS} One Solution Cell Proliferation Assay, Promega) を、アポトーシスの指標として Caspase 3 の活性 (CaspACE Assay System, Colorimetric, Promega) を測定した。

C. 研究結果

10%牛胎仔血清 (FCS) を含む培養液で維持したE6細胞にWNVを1 multiplicity of infection (m. o. i.)あるいは10 m. o. i. で感染すると、感染後3日目の細胞では円形化と浮遊化が顕著に認められた (図1, 1-2, 1-3)。一方、SFMに馴化させたE6/SFM細胞 (図1, 1-5, 1-6) と非感染 (Mock) のE6 (図1, 1-1)、E6/SFM (図1, 1-4) 細胞では、CPEは認められなかった。また、E6およびE6/SFM細胞を10 m. o. i. でWNVを感染し、図2に示す割合に牛胎児血清 (FCS) を含む培養液で3日間培養したところ、E6ではFCSの有無に関係なくCPEが認められたが、E6/SFM細胞ではCPEは認められなかった (図2)。

次に、WNVのEg101株のE6 (図3, ◆) とE6/SFM (図3, ■) 細胞での増殖を検討した。E6細胞では、感染後3日目にピークに達し (2.1×10^9 P. f. u.)、その後、細胞の変性に伴って急激に減少した。一方、E6/SFM細胞では培養上清中のウイルス力価は2日目にピーク (2.6×10^{10} P. f. u.) に達した。また、感染後2日目での細胞ライセートと培養液中のWNVのE蛋白質を検出したところ、E6/SFM細胞ではE6細胞に比較して検出されたE蛋白質量は多かった (図4)。以上のことから、E6/SFM細胞ではE6細胞に比べてWNVが効率的に増殖することが示された。E6/SFM細胞ではWNVを感染した後、見かけ上、CPEは認められなかった。しかし、生細胞数を測定したところ感染後1日目より急激に減少していた (図5, A)。この細胞死は、Caspase-3に非依存的であった (図5, B)。また、培養液のpHを測定したところ、感染後急激に減少していた (図5, C)。

D. 考察

WNVはE6/SFM細胞において効率良く増

殖するが、WNV感染に伴ったCPEは認められなかった。この現象は、無血清の状態でウイルスを高力価、高純度に精製できる可能性を示唆している。しかし、感染後2日目より、培養上清のpHの急激な低下が認められ、上清中に存在するウイルスが不安定になり、実際のウイルス力価の減少に繋がっているものと考えられる。pHを維持するため、HEPES等の緩衝剤を培地に添加するなどの改良が必要であると考えられた。また、E6/SFM細胞では、ウイルスの増殖が良いため、変異したウイルスの産生の有無などを考慮しなければならない。

E. 結論

無血清培地に馴化させたVero E6 (E6/SFM)細胞を用いて、WNVの無血清培養系を確立することが出来た。本システムを使用することで、血清成分を考慮することなく、安定した実験結果が得られるばかりでなく、培養細胞を用いた安全な新規ワクチンの開発が可能となるものと考えられる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

前田秋彦、前田潤子、高木弘隆、荻野倫子、倉根一郎、堀内基広、無血清培養Vero E6細胞でのウエストナイルウイルスの増殖。第52回日本ウイルス学会 (横浜) 11/22-23/2004

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

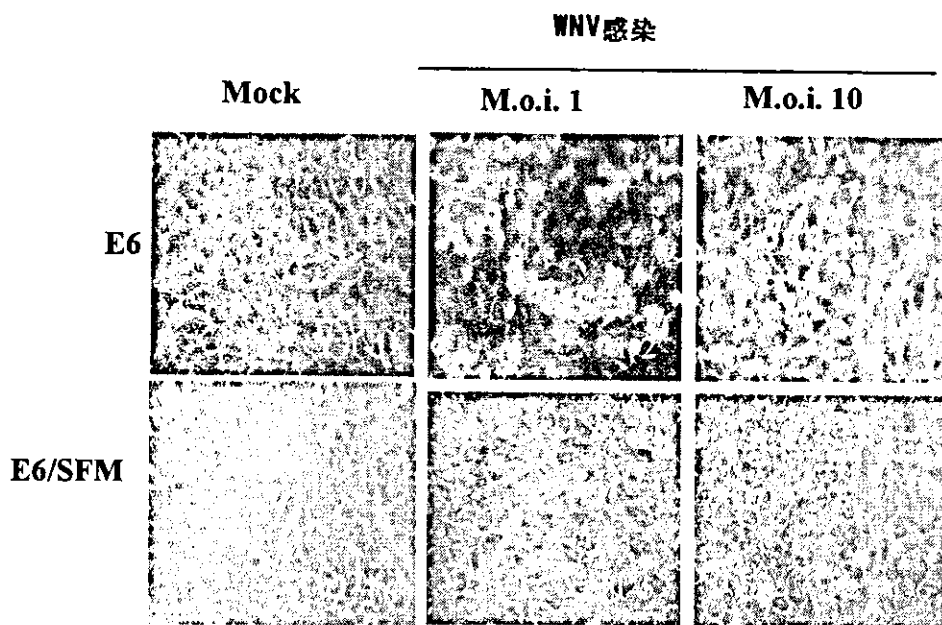


図1. WNV感染に伴ったE6およびE6/SFM細胞の変性

E6細胞(1-1, 1-2, 1-3)と無血清培地に馴化させたE6/SFM細胞(1-4, 1-5, 1-6)にWNV-Eg101株を1 m. o. i. (1-2, 1-5)あるいは10 m. o. i. (1-3, 1-6)で感染後、3日目におけるCPEを観察した。陰性コントロールとして非感染(Mock, 1-1, 1-4)細胞を観察した。

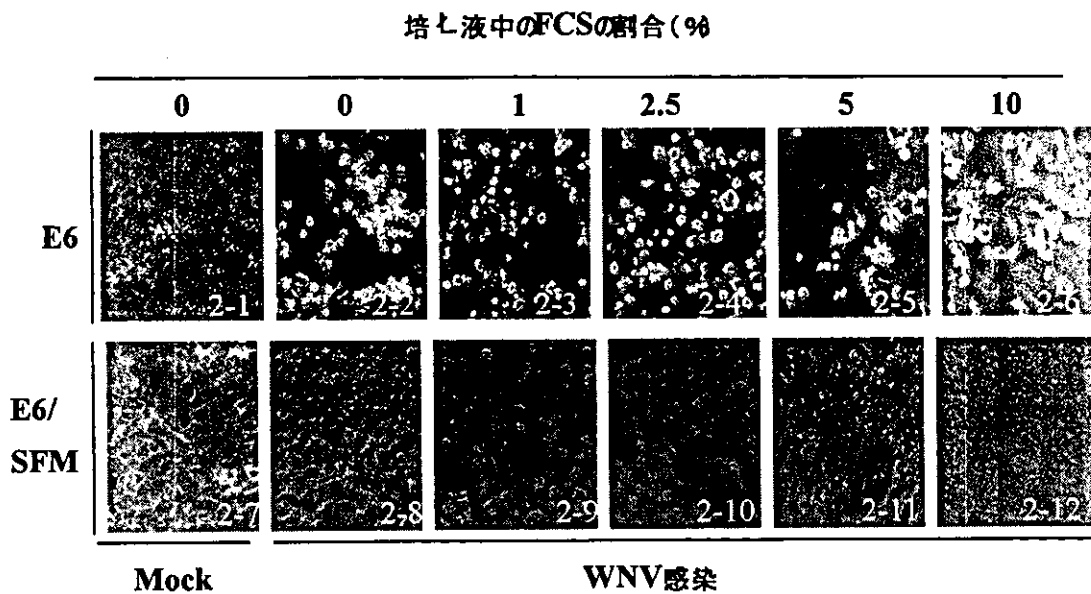


図2. WNV感染に伴った細胞変性におよぼすFCSの影響

E6(2-1から2-6)とE6/SFM細胞(2-7から2-12)にWNVを10 m. o. i. で感染し、0(2-2, 2-8)、1(2-3, 2-9)、2.5(2-4, 2-10)、5(2-5, 2-11)および10(2-6, 2-12)%の割合にFCSを含む培養液で3日間、培養した時のCPEを観察した。陰性コントロールとして非感染(Mock)のE6(2-1)とE6/SFM細胞(2-7)を観察した。

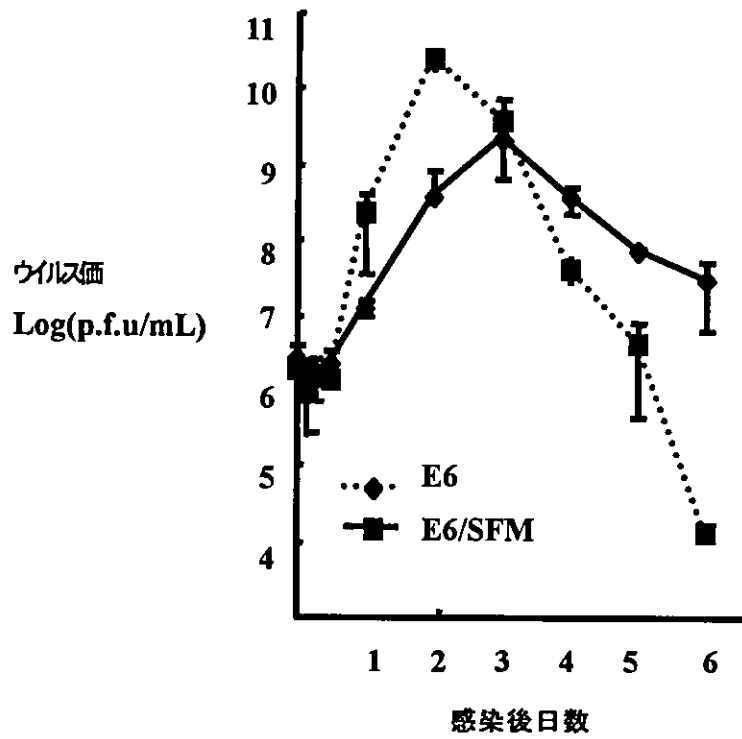


図3. E6とE6/SFM細胞におけるWNVの増殖

E6(◆)とE6/SFM細胞(■)にWNV-Eg101株を10 m. o. i.で感染し、感染後の培養液のウイルス価の経時的な変化をプラークアッセイ法により測定した。

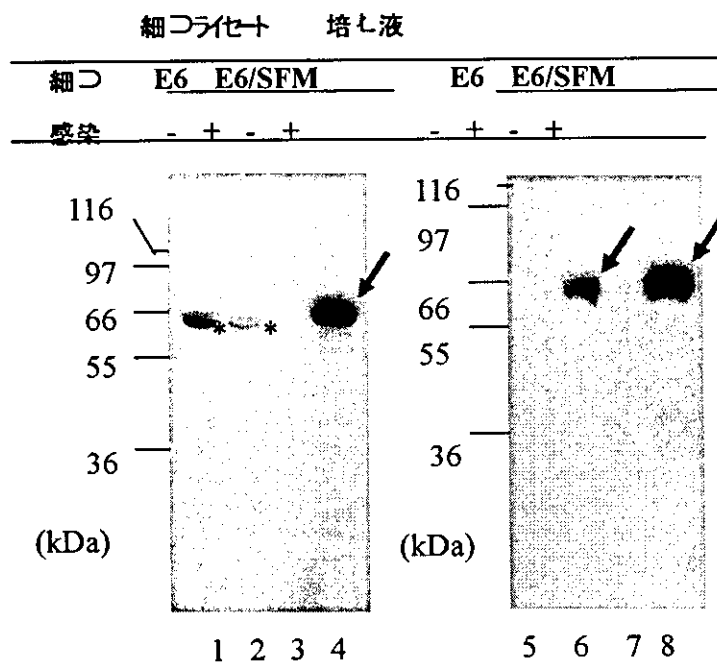


図4. E6とE6/SFM細胞におけるWNVのE蛋白質の合成

E6(レーン 1, 2, 5 および 6)と E6/SFM 細胞(レーン 3, 4, 7 および 8)に WNV-Eg101 を感染(レーン 2, 4, 6 および 8)し、2 日目に細胞ライセート(レーン 1, 2, 3 および 4)と培養液(レーン 5, 6, 7 および 8)に存在する E 蛋白質をウエスタンブロット法により検出した(矢印)。*は使用した抗体の非特異的な反応を示す。

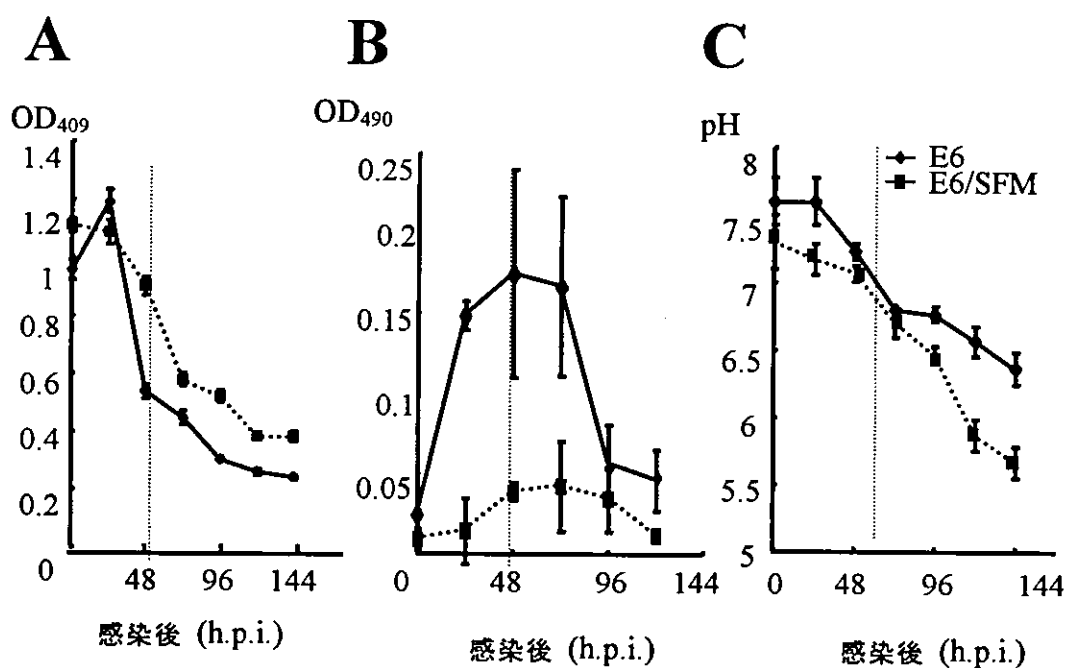


図5. WNV感染に伴うE6とE6/SFM細胞の生細胞数、Caspase-3活性、培養液のpHの変化

10 m. o. i. の WNV-Eg101 感染後の E6(◆)と E6/SFM 細胞(■)の生細胞数(A)、Caspase-3 活性(B)、培養液の pH(C) を測定した。生細胞数はテトラゾリウム化合物の還元により測定した。Caspase-3 活性は細胞のアポトーシスの指標とした。