

図 1. 2004 年, 2005 年の気温の変化とアカイエカおよびチカイエカの飼育実験を実施した期間

表 1. アカイエカおよびチカイエカの飼育実験を実施した期間の日平均気温 (±SD)
アカイエカ

調査期間	日平均気温
①2005年4月	18.9 ± 1.6
②2005年5月	21.6 ± 1.9
③2005年6月	24.0 ± 1.0
④2005年7月	25.4 ± 1.8
⑤2005年7月末	28.1 ± 1.8

調査期間	日平均気温
⑥2005年8月	30.6 ± 0.9
⑦2005年8月末	27.7 ± 1.6
⑧2005年9月	26.1 ± 1.8
⑨2005年10月	22.2 ± 1.4

チカイエカ

調査期間	日平均気温
①2004年6月	28.1 ± 1.8
②2004年8月	26.7 ± 2.1
③2004年9月	26.3 ± 1.9
④2004年10月	21.4 ± 1.9

調査期間	日平均気温
⑤2005年4月	19.4 ± 2.14
⑥2005年5月	20.3 ± 1.74
⑦2005年6月	23.3 ± 0.78
⑧2005年7月	27.0 ± 2.32

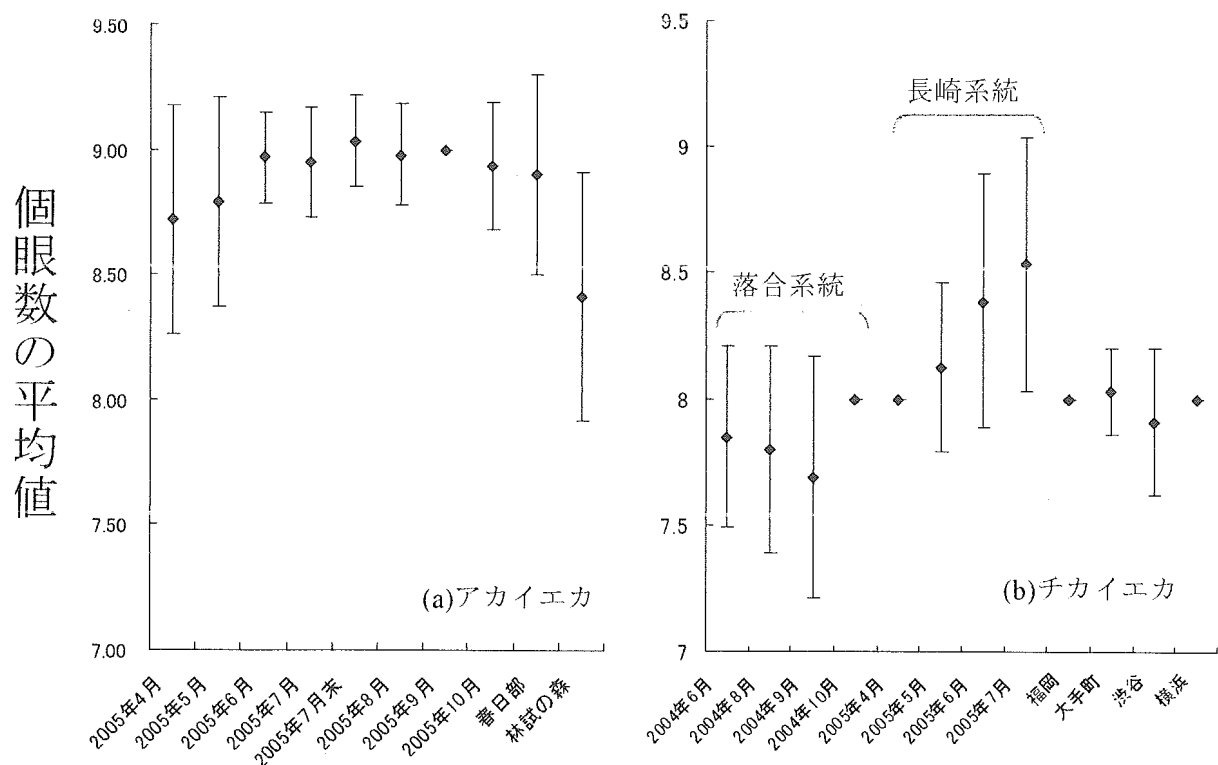


図 2. 複眼右側 5 列目の個眼数の平均値と標準偏差

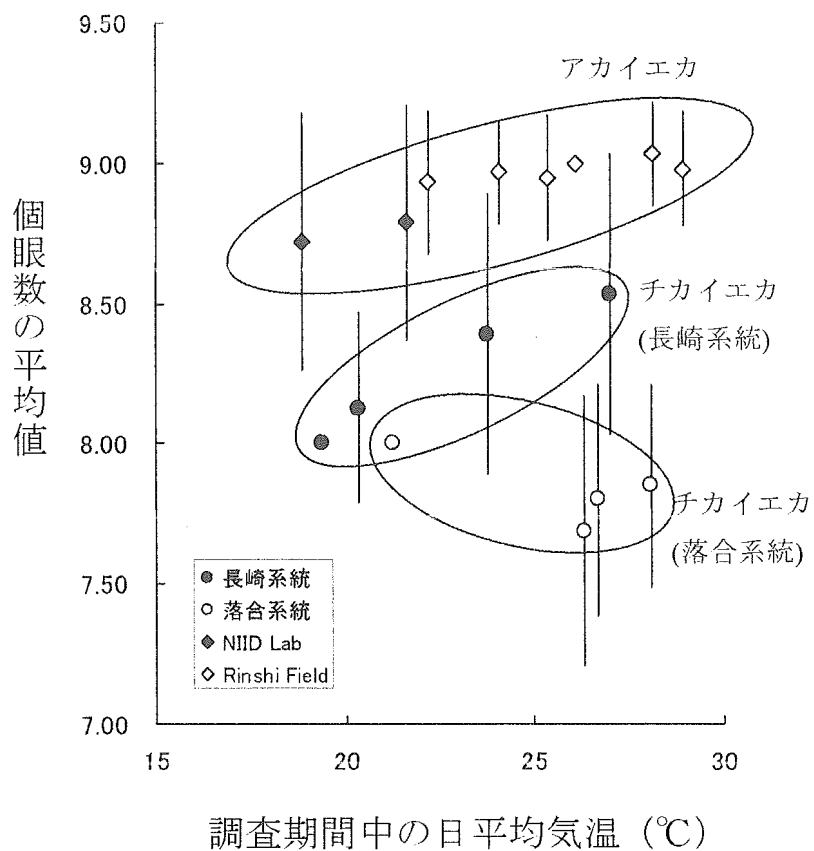


図 3. 幼虫発育期間の平均気温と個眼数の関係

表 2. アカイエカとチカイエカの個眼数の頻度分布に見られる重複度

	全個体の 重複度	個眼数が左右同数の 個体の重複度
2005年4月	12.0	15.8
2005年5月	28.7	14.8
2005年6月	32.9	49.8
2005年7月	38.3	46.8

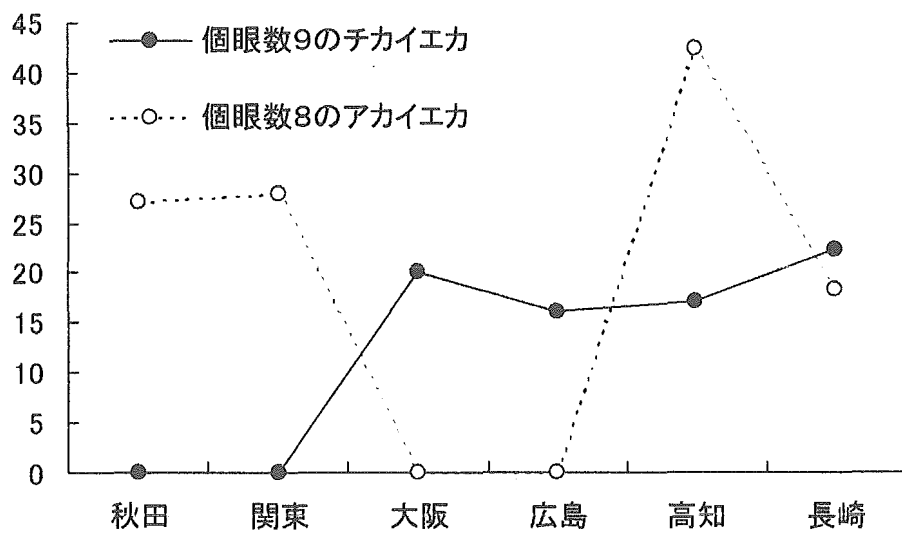


図4. 6地域より得られたサンプルにおける個眼数が9個のチカイエカおよび個眼数が8個のアカイエカの構成比率

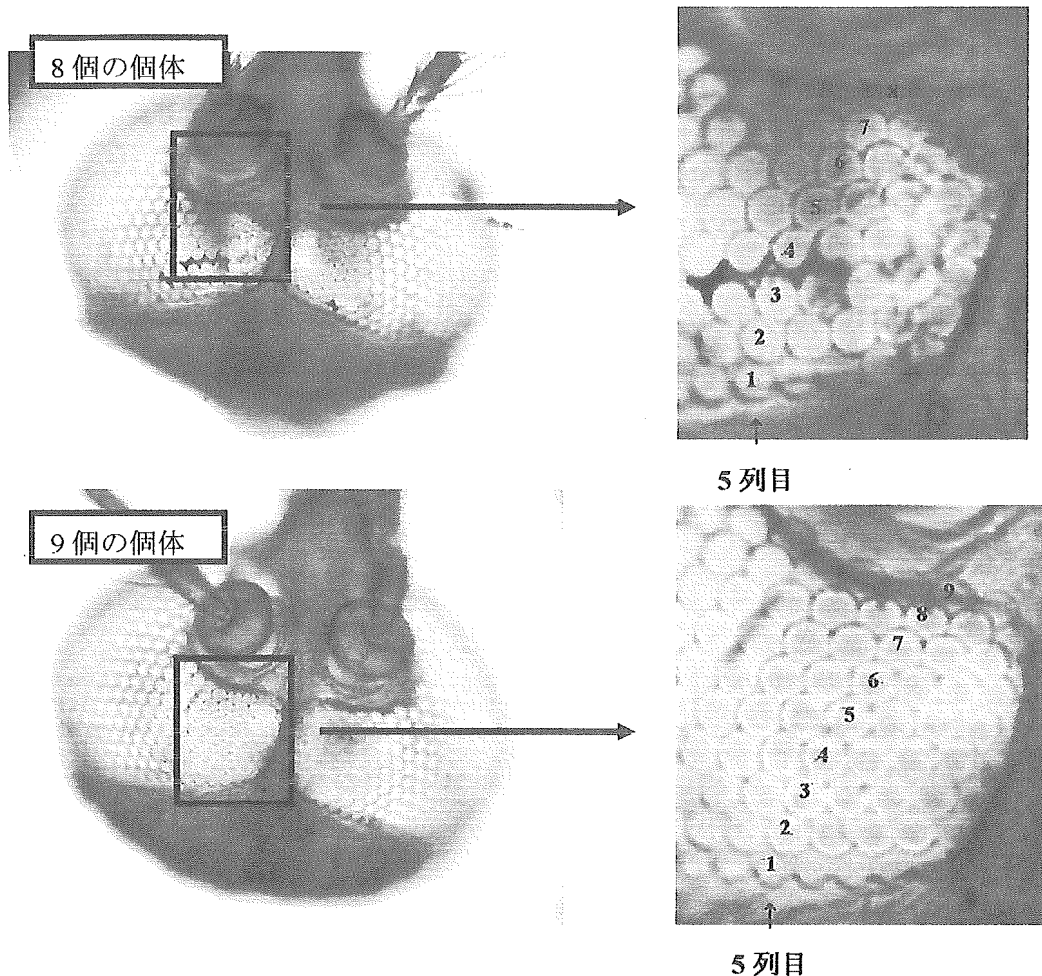
付録 アカイエカ群個眼数計測法

サンプル処理

- ① 雌成虫の頭部を切断する。
- ② 切断した頭部を適当な小容器に入れて、5%NaOH もしくは 5%KOH 溶液を加え、85~90°Cで 40分または室温で一昼夜放置して透明化する。処理時間が長すぎるとサンプルがもろくなるので注意する。サンプルの体色が薄くなり溶液中に沈むようになれば次の処理へ進む。
- ③ アルカリ溶液を吸い取り、水で1~2回ほど洗う（この作業を怠るとサンプルが汚くなり後の検鏡が困難となる）。
- ④ 水を吸い取り、99.9%エタノールを加えて15分間浸して脱水を行う。この作業を2~3回繰り返す（回数はサンプル数による。サンプル数が多ければ脱水回数を増やす。30頭分の場合、3回の脱水を行う。）。この脱水処理は省略してもよいが、その場合はよく水を吸い取るように注意する。
- ⑤ エタノールを吸い取り、100%グリセリンに保存する。

検鏡

- ① スライドグラス上にグリセリンを1滴落とし、処理した頭部をのせて背面から生物顕微鏡で検鏡する。
- ② 正中線から数えて3、4、5列目の個眼数を数えて記録する（倍率100）。
- ③ 5列目の個眼数を用いて、8個以下の個体をチカイエカ、9個以上の個体をアカイエカとしている。しかしながら5列目が適当かどうかはなお検討が必要であるので、4、5、6列目について個眼数を記録しておくことを薦める。左右どちらを対象としてもよいが、どちらにするかは決めておく。



鳥類における WNV 検出および抗 WNV 抗体検出法の確立に関する研究

分担研究者 山田 章雄 国立感染症研究所 獣医科学部 部長

協力研究者 今岡 浩一 国立感染症研究所 獣医科学部 主任研究官

研究要旨： WNV の日本への侵入や、国内での流行の拡大には、野鳥の果たす役割も大きいと考えられる。そこで、鳥における WNV や WNV に対する抗体を検出する方法の確立を行った。

1. 陽性対照ニワトリ血清の作製： ニワトリを、FCA および FIA を用いてホルマリン不活化 WNV または JEV で 5 回免疫し、陽性対照血清を作製した。これらの血清を用いて PRNT を行ったところ、免疫血清では、JEV 免疫血清でも WNV と若干の交差反応を示したが、WNV で免疫したトリ血清では JEV との交差反応が強く認められた。一方、CDC より分与を受けた感染後トリ血清では JEV との交差反応はほとんど見られず、WNV に強い特異性を示した。

2. 鳥類における WNV に対する中和抗体保有状況の検討： 鳥類における WNV および JEV に対する中和抗体を PRNT で検討した。ウイルスとして、WNV は NY99-6922 株、JEV は JaGAr01 株を用いた。サンプルは渡り鳥（シギ、チドリ、ミヤマガラス）および留鳥（ナキアヒル、カラス、スズメ、ハト、ニワトリ）の血清を用いた。検査した鳥類すべて、WNV および JEV に対する中和抗体は検出されなかった。

3. WNV および JEV 遺伝子検出法の設定： 文献をもとに、WNV 検出には Poly Protein (WNV-PoPr)、Envelope (WNV-Env)、JEV は Envelope (JEV-Env)、両者共通の物として NS3 (WJ-NS3) に対する Primer を作製し、PCR の条件検討を行った。検出感度は、WNV-PoPr が 1-10、WNV-Env が 10、JEV-Env が 10、WJ-NS3 が 100 PFU/reaction であった。さらに WNV 検出のために、3'NC、Envelope (WNV-3NC、WNV-EnvRT) に対する Primer と TaqMan Probe を作製した。その感度は、抽出 RNA を用いた Real-Time RT-PCR では、WNV-EnvRT が 0.1、WNV-3NC が 0.1-1 PFU/reaction であった。

A. 研究目的

ウエストナイルウイルス (WNV) は、蚊と鳥の間で感染環が維持され、主に蚊を介してヒトに感染し急性熱性疾患や脳炎を引き起こし、アフリカ、東ヨーロッパ、西アジアなどで流行が報告されている。1999 年にはニュー

ヨークで発生し、わずか数年で全米に流行が拡大したが、その拡大には野鳥の関与が考えられている。また、近年、ロシアで、野鳥の WNV 感染が確認され、その感染が西アジア方面からシベリア方面にまで広がってきている傾向が見られ、患者報告もなされている。WNV のこれらの地域から日本への侵入や、国内で

の流行の拡大には、野鳥の果たす役割も大きいと考えられる。そこで、WNV の国内への持ち込みや流行に備えるためには、鳥における WNV や WNV に対する抗体の検出法の確立が必要となる。そこで、本研究では、抗体検査のために必要となる陽性対照血清の作製と、トリ血清サンプルにおける中和抗体検索を実施し、鳥における WNV に対する抗体測定法の確立を試みた。また、ウイルス検出のための PCR、Real-Time RT-PCR の条件検討もあわせて行った。

B. 研究方法

1. 陽性対照ニワトリ血清の作製と感染後トリ血清： 陽性対照ニワトリ血清の免疫は業者者に委託した。

(1) 抗原： ホルマリン不活化 WNV およびホルマリン不活化日本脳炎ウイルス (JEV) を用いた。1 回当たりの免疫抗原量は、WNV が 40 ug、JEV が 100 ug 使用した。

(2) 免疫動物とスケジュール： 各群 4~5 ヶ月令の 2 羽のニワトリ (白色レグホン) を使用し、Freund's complete/incomplete adjuvant を用いて、2 週間間隔で合計 5 回、皮内に免疫した。最終免疫の 1 週間後に全採血し、血清を分離、保存した。初回免疫は 2005 年 10 月 31 日であった。

(3) 感染後トリ血清： CDC の Dr. Komar より、WNV 感染前後のスズメ (House Sparrow) およびハト (Rock Dove) 血清 (ウイルス (-) : 各 1 羽) の分与をうけた。

2. 鳥類サンプル： 渡り鳥は、シギおよびチドリ (合計 33 羽。2005 年 9 月に千葉県小櫃川河口にて採取。山階鳥類研究所より分与) とミヤマガラス (12 羽。2006 年 1 月に秋田県大瀧村で採取) の血清を用いた。留鳥は、ナキアヒル (4 羽。国内繁殖)、スズメ (3 羽)、ハト (5 羽)、カラス (3 羽)、ニワトリ (日生

研 LM。10 羽) の血清を入手し用いた。

3. 中和抗体の測定 (PRNT) : WNV は NY99-6922 株、JEV は JaGAR01 株を、サンプルは 25 倍希釈より用い、定法どおり実施した。結果は 90% 減少 (PRNT₉₀) を示すサンプル希釈濃度で示した。

4. 特異抗体の測定 (indirect ELISA) : 抗原としてホルマリン不活化 WNV または JEV を、96well マイクロプレートにコーティングし、ブロッキング後サンプルを反応させた。次に、二次抗体を反応させ、OPD+H₂O₂ を用いて発色を見た。二次抗体には、HRPO 標識抗トリ IgG-ヒツジ IgG (ハト、アヒル、スズメ、ニワトリ IgG で免疫。Bethyl)、HRPO 標識抗ニワトリ IgG-ヒツジ IgG (Southern Biotech)、HRPO 標識抗七面鳥 IgG-ヒツジ IgG (Southern Biotech)、HRPO 標識抗ハト IgG-ウサギ IgG (Nordic Immunol.)、HRPO 標識抗アヒル IgG-ウサギ IgG (Nordic Immunol.) を入手し、比較検討を行った。

5. ウイルス RNA の抽出と cDNA の作製 : WNV および JEV の培養上清から QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN) を用いて、添付のプロトコールに従い RNA を抽出した。cDNA は、SuperScript III (Invitrogen) と Random Hexamer Primer を用いて、抽出した RNA より作製した。

6. WNV および JEV 遺伝子検出のための PCR、Real-Time RT-PCR : 文献をもとに WNV 検出のために、Poly Protein (WNV-PoPr: Lanciotti RS et al), Envelope (WNV-Env: 感染研マニュアル) に対する Primer と、JEV には Envelope (JEV-Env: 感染研マニュアル) に対する Primer を、また、両者を検出するものとして、NS3 (WJ-NS3: 感染研マニュアル) に対する Primer を作製し、サンプルには cDNA を用いて PCR の条件検討を行った。さらに、WNV につい

ては、3'NC, Envelope (WNV-3NCRT, WNV-EnvRT: Lanciotti RS et al) に対する Primer と TaqMan Probe を作製し、サンプルに RNA を用いた Real-Time RT-PCR と cDNA を用いた Real-Time PCR を Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System を用いて比較検討した。

C. 研究結果

1. 免疫ニワトリ血清および感染トリ血清の WNV および JEV に対する抗体： JEV および WNV 免疫ニワトリ血清の JEV (Fig. 1a)、WNV (Fig. 1b)に対する抗体応答を ELISA で測定した結果を示した。JEV 免疫ニワトリ、WNV 免疫ニワトリともにそれぞれの免疫抗原に対して高い抗体応答を示したが、どちらもヘテロの抗原に対しても抗体応答を示した。特に、WNV 免疫ニワトリは JEV 免疫ニワトリよりもヘテロの抗原に対する抗体応答が強く認められた。

それぞれの血清を用いて JEV および WNV に対する中和抗体を PRNT により検討したところ、JEV 免疫ニワトリ血清は JEV に対して非常に強い中和活性を示し、WNV には中和活性を示さなかった。一方、WNV 免疫ニワトリ血清も WNV に対して強い中和活性を示したものの、ヘテロである JEV に対してより強い中和活性を示した (Table 1)。

また、CDC より入手した WNV 感染トリ血清は、ELISA で WNV にのみ強い抗体応答を示し (Fig. 2)、PRNT による中和活性もヘテロである JEV には活性を示さず、WNV に対して強い特異性を示した (Table 1)。

2. 鳥類サンプルの WNV および JEV に対する中和抗体 (PRNT)： 検討した渡り鳥では夏鳥であるシギ・チドリも、冬鳥であるミヤマガラスも、すべて WNV および JEV に対する中和活性は示さなかった (Table 2)。また、留鳥もすべて、WNV および JEV に対する中和

活性は示さなかった (Table 2)。

3. WNV および JEV 検出のための PCR および Real-Time RT-PCR： PCR の検出感度は、WNV-PoPr が 1-10、WNV-Env が 10、JEV-Env が 10、WJ-NS3 が 100 PFU/reaction であった (Table 3)。

また、cDNA を用いた Real-Time PCR では、WNV-EnvRT が 1、WNV-3NCRT が 1-10 PFU/reaction であった (Table 3)。一方、抽出 RNA を用いた Real-Time RT-PCR では、WNV-EnvRT が 0.1、WNV-3NC が 0.1-1 PFU/reaction と、RT-PCR よりも約 100 倍、cDNA を用いた Real-Time PCR よりも約 10 倍感度が良かった (Fig. 3、Table 3)。

D. 考察

ニワトリを免疫して WNV および JEV に対する抗血清を作製したが、その抗原に対する反応性は、JEV 免疫血清では JEV に特異性が高かったのに対し、WNV 免疫血清では JEV に対する交差反応が強く見られた。このことは、CDC より入手した WNV 感染血清が WNV にのみ強く反応したことと異なる結果となった。免疫による抗体応答と、感染に対する抗体応答の違いとも考えられるが、免疫に用いたニワトリが JEV に感染した可能性も考えられる。事実、今回、免疫に用いたニワトリは、コンベンショナルであり、免疫前、免疫中ともに開放型の建物で飼育されていた。また、生まれた時期が 6～7月であり、免疫開始が 10月末、免疫終了が 1月と、その期間が蚊の活動時期と一致してしまった。近辺に豚の飼育施設はなかったが、この飼育環境と時期により、JEV に感染した可能性が強く疑われる。再度、免疫する際には注意する必要があると考えられた。ただ、このことは、国内の鳥類が自然界で JEV に感染している可能性を示しているとも考えられ、鳥類の抗体を検査し、結果を検討する際に留意しておく必要がある

と考えられた。今回、渡り鳥および留鳥の WNV および JEV に対する抗体を検討したが、PRNT では中和抗体は検出されなかった。データは示さないが、同一サンプルを用いて ELISA による抗体を検査しているが、自然での JEV 感染を疑わせるような結果も得られている。このことについてはその反応の特異性についてさらに検討してから報告する必要があると考えられた。

また、文献をもとに WNV および JEV 検出のための、PCR ならびに Real-Time RT-PCR を検討した。抽出 RNA を用いた Real-Time RT-PCR が、RT-PCR よりも約 100 倍、cDNA を用いるよりも約 10 倍感度が良く、実際の検査の際には、最も有効であると考えられた。

E. 結論

1. 陽性対照ニワトリ血清の作製：

ニワトリを、ホルマリン不活化 WNV または JEV で免疫し、陽性対照血清を作製し、PRNT を行ったところ、免疫血清では、JEV 免疫血清でも WNV と若干の交差反応を示したが、WNV で免疫したトリ血清では JEV との交差反応が強く認められた。一方、CDC より分与を受けた感染後トリ血清では JEV との交差反応はほとんど見られず、WNV に強い特異性を示した。

2. 鳥類における WNV に対する中和抗体保有状況の検討：

鳥類における WNV および JEV に対する中和抗体を PRNT で検討した。渡り鳥（シギ、チドリ、ミヤマガラス）および留鳥（合鴨、カラス、スズメ、ハト、ニワトリ）ともに、すべて、WNV および JEV に対する中和抗体は検出されなかった。

3. WNV および JEV 遺伝子検出法の設定：

文献をもとに、WNV および JEV 検出のための PCR ならびに Real-Time RT-PCR を検討したところ、抽出 RNA を用いた Real-Time RT-PCR が、RT-PCR よりも約 100 倍、cDNA を用いるよりも約 10 倍感度が良かった。

F. 健康危害情報

なし

G. 研究発表等

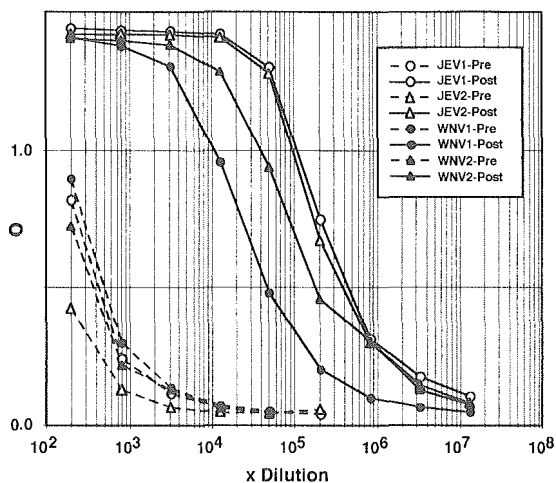
なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

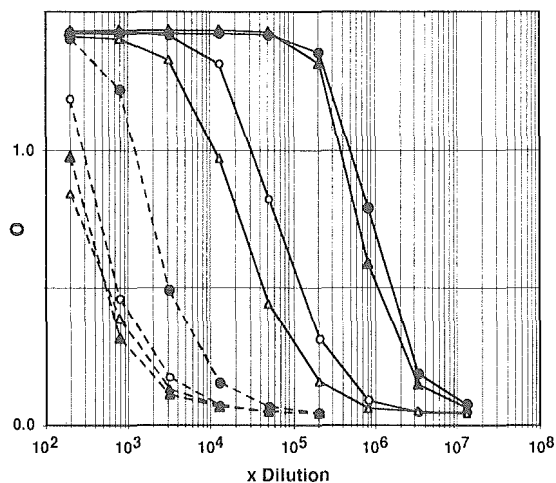
なし

Fig. 1) 免疫ニワトリ血清の JEV (a) および WNV (b) に対する抗体 (ELISA)

a) Anti-JEV IgG



b) Anti-WNV IgG

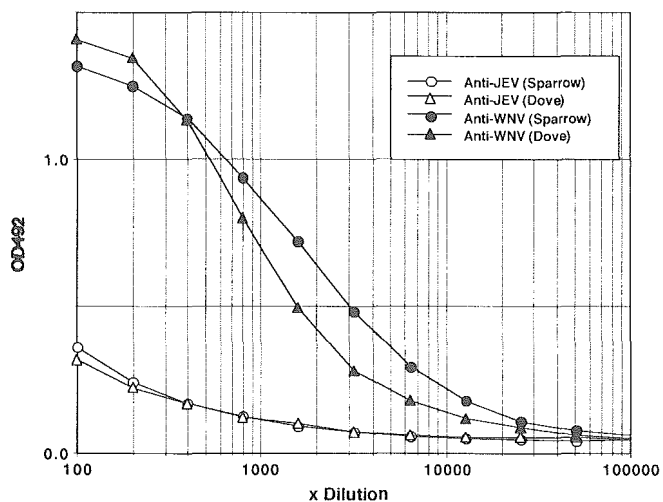


* Pre: 免疫前血清、Post: 5 回免疫後血清

* JEV1, 2: JEV 免疫ニワトリ #1, #2

* WNV1, 2: WNV 免疫ニワトリ #1, #2

Fig. 2) 感染・非感染トリ血清の JEV および WNV に対する抗体 (ELISA)



* Sparrow: House Sparrow、Dove: Rock Dove

Table 1) 感染トリ血清および免疫ニワトリ血清の JEV および WNV に対する中和抗体 (PRNT₉₀)

		JEV	WNV
Uninfected/ Infected Birds (CDC)	House Sparrow (-)	<25	<25
	House Sparrow (+)	<25	300
	Rock Dove (-)	<25	<25
	Rock Dove (+)	<25	75
Immunized Chicken	JEV-1	400<	<25
	JEV-2	400<	<25
	WNV-1	400<	100
	WNV-2	400<	400

* 数値は血清希釈倍率

Table 2) 各種トリ血清の JEV および WNV に対する中和抗体 (PRNT₉₀)

	n=	JEV	WNV
シギ・チドリ	33	<25	<25
ミヤマガラス	12	<25	<25
ハシボソガラス	3	<25	<25
ハト	5	<25	<25
スズメ	3	<25	<25
ナキアヒル	4	<25	<25
ニワトリ	10	<25	<25

* n: 検体数

* 数値は血清希釈倍率

Fig. 3) Real-Time RT-PCR による WNV (env) 遺伝子の検出 (PFU/Reaction)

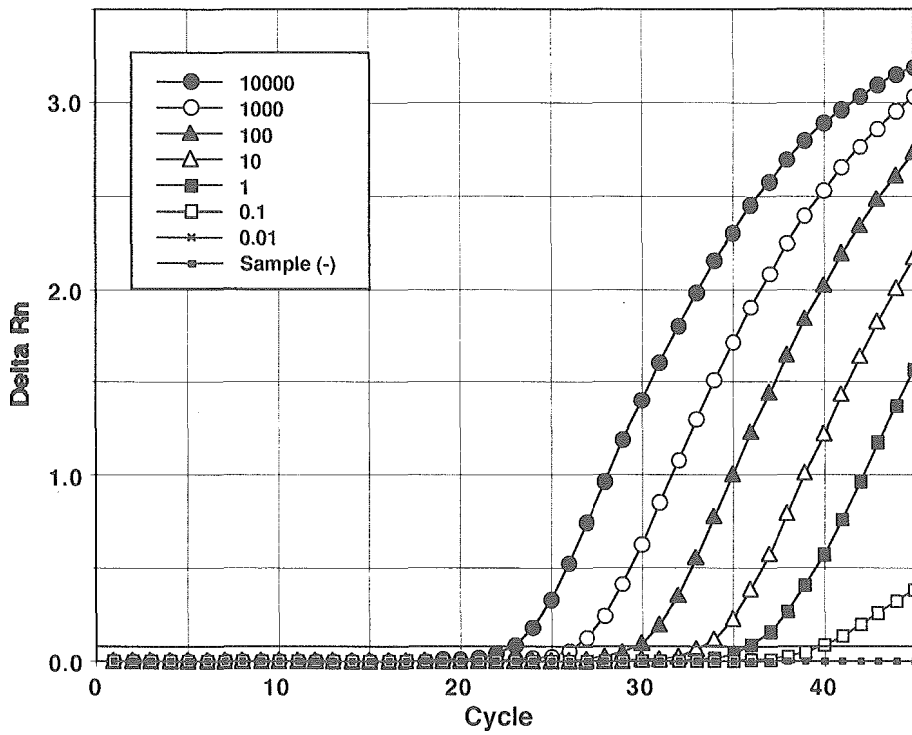


Table 3) PCR, Real-Time PCR, Real-Time RT-PCR による JEV および WNV 遺伝子の検出感度 (PFU/Reaction)

Assay		WNV	JEV
PCR (cDNA)	Poly Pr.	1-10	ND
	ENV (WNV)	10	ND
	ENV (JEV)	ND	1
	NS3	100	100
Real-Time PCR	ENV	1	ND
Two Step (cDNA)	3'NC	1-10	ND
Real-Time RT-PCR	ENV	0.1	ND
	One Step (RNA)	3'NC	0.1-1

* ND: not detected

分担研究報告書

ウエストナイルワクチン開発に関する研究

分担研究者 森田 公一（長崎大学熱帯医学研究所 教授）

研究要旨：

ウエストナイルウイルスは人や馬での感染では急性熱性感染症を引きおこし、時には中枢神経系に侵入し髄膜炎・脳炎を発症することが知られている。日本でもウエストナイルウイルスが侵入し定着した場合、多くの動物での発生ならびにヒトにおいても多くの脳炎患者が発生することが危惧される。したがって、本研究ではヒト用不活化ワクチン並びに家畜用リコンビナント生ワクチン開発を目的としている。ヒト用不活化ワクチンには、Vero 細胞を用いた組織培養法でウエストナイルウイルス NY 9 9 株を増殖し、ホルマリン処理により不活化させた。ワクチン効力試験をマウスにて実施したところウエストナイルウイルス NY 9 9 株（100MLD₅₀）の攻撃に対し 100%感染防御効果を示した。家畜用リコンビナント生ワクチン開発には、Fusion-PCR 法によりウエストナイルウイルス NY 9 9 株の E 蛋白遺伝子を弱毒日本脳炎生ワクチン株（ML 17 株）に挿入したキメラウイルスを作出した。このキメラウイルスの生物学的性状を解析したところ、ウエストナイルウイルス NY 9 9 株と比較して大幅に病原性、神経侵襲性、神経毒性が低下しており、弱毒株であることを確認した。次いで、ワクチン効力試験をマウスにて実施したところウエストナイルウイルス NY 9 9 株（100MLD₅₀）の攻撃に対し 100%感染防御効果を示した。

A. 研究目的

ウエストナイルウイルスはアフリカ、中近東、西アジアなどの旧大陸に広く分布する蚊媒介性ウイルスでありフラビウイルス科に属する。人や馬での感染では急性熱性感染症を引きおこし、時には中枢神経系に侵入し髄膜炎・脳炎を発症することが知られている。ウエストナイルウイルスは 1999 年に米国に侵入し、2003 年には米国全土のみならずカナダやメキシコ

にも波及している。2005 年には米国だけで 2799 名（102 名死亡）の患者数を記録し、重大な社会問題となっている。この米国に侵入した株は従来旧大陸で流行していた株と比較してウイルス増幅動物である鳥での病原性が強く、人に感染した場合の髄膜炎・脳炎発症率が高いことなど極めて強毒な株である。日本でも 2005 年夏に初の患者（米国からの輸入例）が報告され、ウエストナイルウイルスが定着した

場合、多くの患者が発生することが危惧される。したがって、本研究ではヒト用不活化ワクチンと家畜用リコンビナント生ワクチン開発を目的としている。

B. 研究方法

[1] ヒト用ウイルス不活化ワクチン

1) 不活化ワクチンの作成

ウエストナイルウイルス (NY99 株) をホルマリンにて不活化した。

2) ワクチン効力検定

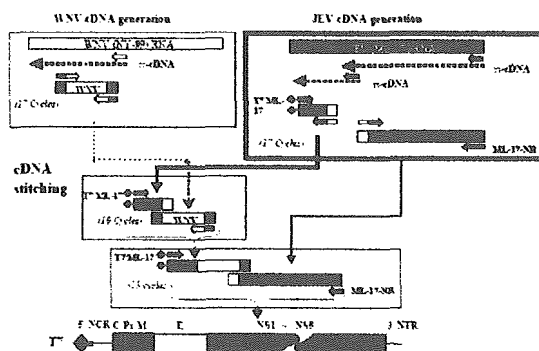
C57B/6N マウスを用い試作ワクチンを一週間間隔で 2 回腹腔内投与し、2 回目の投与から 14 日後に致死量の攻撃ウイルス (100MLD₅₀) を腹腔内投与し、16 日間症状の出現と死亡の有無を観察、記録した。

[2] 遺伝子組換えキメラウイルス生ワクチン

1) キメラウイルスの作出

ウエストナイルウイルス (NY99 株) のエンベロープ領域遺伝子を PCR により増幅し、エンベロープ領域以外の構造タンパク領域 (C、prM) + 5' 非翻訳領域のフラグメント並びに非構造タンパク領域 (NS1、NS2a、NS2b、NS3、NS4 a、NS4 b、NS5) + 3' 非翻訳領域のフラグメントは日本脳炎ウイルス (ML-17 株) を鋳型として 2 つあるいは 3 つのフラグメントを同時に鋳型として PCR を行い一本の DNA にする FusionPCR を行い、最終的に全長 DNA を作出した。(下図参照)

Construction strategy: JEV(ML-17)/WNV(NY-99) Chimera virus



In Vitro Transcription 法により RNA を作り、

Electroporation 法により C6/36 細胞内に遺伝子導入してその細胞を培養する事により子孫ウイルス (ウエストナイルウイルスと日本脳炎ウイルスのキメラウイルス) を回収した。ブランク法によりクローン純化を行ない、その内 2 クローン (3-1 株および 3-2 株) をそれ以後の試験に用いた。

2) ワクチン効力検定

C57B/6N マウスを用い 2 クローンのキメラウイルスを各種濃度 (10⁷、10⁶、10⁵、10⁴、10³、10²、10、1FFU/マウス) 用意して一回腹腔内投与し、14 日後に致死量の攻撃ウイルス (100MLD₅₀) を腹腔内投与し、16 日間症状の出現と死亡の有無を観察、記録した。

3) 神経侵襲性試験

C57B/6N マウスを用い 2 クローンのキメラウイルスを各種濃度 (10⁷、10⁶、10⁵、10⁴、10³、10²、10、1FFU/マウス) 用意して一回腹腔内投与し、16 日間症状の出現と死亡の有無を観察、記録した。

4) 神経毒性試験

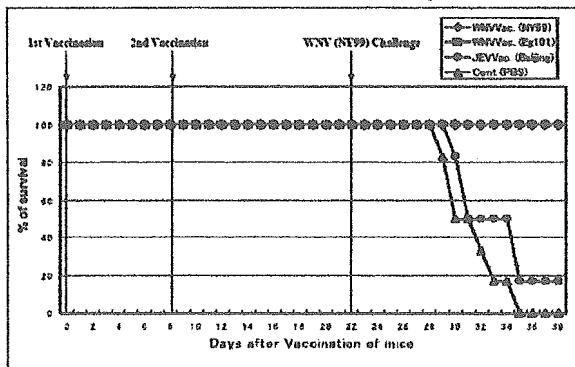
C57B/6N マウスを用い 2 クローンのキメラウイルスを各種濃度 (10⁷、10⁶、10⁵、10⁴、10³、10²、10、1FFU/マウス) 用意して一回脳内投与し、16 日間症状の出現と死亡の有無を観察、記録した。

C. 結果

[1] ヒト用ウイルス不活化ワクチン

西ナイルウイルス NY 株を大量培養した Vero 細胞に感染させ低濃度のホルマリンにより不活化する方法で不活化ワクチンを 2 ロット作製し動物実験によりその有効性を確認した。ヒトでの臨床試験を目指してさらに大きな規模でのワクチンロットを作製し、GLP 試験を終了し良好な結果を得た。これにより現在ヒトでの 1 相試験を開始する準備を行っている。

West Nile Virus Inactivated Vaccine Efficacy Tests



West Nile Virus Inactivated Vaccine Efficacy Tests in Mice

Vaccine (Strain)	Volume & Route of Vaccination	Volume & Route of Challenge*	Survivor** / Tested	Survival Rate (%)
WNV (NY99)	0.5ml x 2 (i.p.)	1.0ml (i.p.)	7 / 7	100
WNV (Eg101)	0.5ml x 2 (i.p.)	1.0ml (i.p.)	6 / 6	100
JEV (Beijing)	0.5ml x 2 (i.p.)	1.0ml (i.p.)	1 / 6	16.7
No vaccination (PBS)	0.5ml x 2 (i.p.)	1.0ml (i.p.)	0 / 6	0

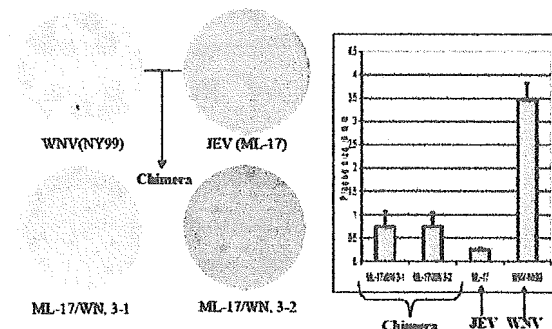
*—Used challenge virus, West Nile Virus (NY99 Strain, 100MLD₅₀/ml), was inoculated to inbred C57BL/6N mice intraperitoneally with needle brain puncture treatment on 22nd day after the 2nd vaccination.

**—Observation of mice survival was done for 17 days after challenge.

[2] 動物用キメラウイルス生ワクチン

弱毒日本脳炎生ワクチン株 (ML17 株) とウエストナイルウイルス NY99 株とのキメラウイルスを作製した。Fusion-PCR 法によりウエストナイルウイルス NY99 株の E 蛋白遺伝子を ML17 株に挿入したキメラウイルスの作製に成功した。

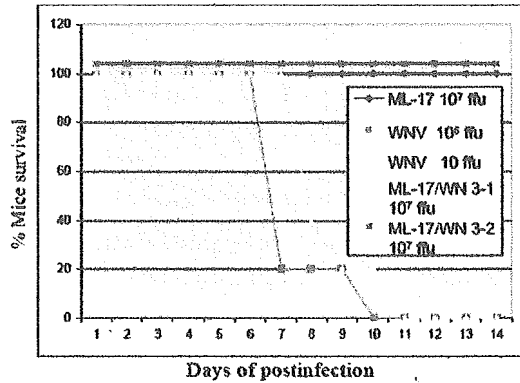
Plaque morphology of original and chimera-viruses in BHK-21 cells



このキメラウイルスの動物 (マウス) での病原性 (腹腔内接種および脳内接種による MLD₅₀)、神経侵襲性試験、神経毒性の定量的解析を実施

したところ、ウエストナイルウイルス NY 株と比較して大幅に病原性、神経侵襲性、神経毒性が低下していることが認められ、弱毒株であることを確認した。

Mouse neuroinvasiveness test (via i.p. route)



Determination of Virulence (MLD₅₀)

Viruses	i.p.MLD ₅₀ (ffu)	i.c.MLD ₅₀ (ffu)
ML-17	>1.0 x 10 ⁷	>1.0 x 10 ⁵
WN-NY99	4.2	2.3
ML-17/WN chimera virus (3-1)	>1.0 x 10 ⁷	3.5 x 10 ⁴
ML-17/WN chimera virus (3-2)	>1.0 x 10 ⁷	2.2 x 10 ⁴

Slightly neuro-virulent

次いで、ワクチン効力試験をマウス 90 匹にて実施したところ 10⁵~10⁷FFU/匹のキメラウイルスをあらかじめ接種したマウス群においてウエストナイルウイルス NY 99 株 (100MLD₅₀) の攻撃に対し 100%感染防御効果を示した。

WNV/JEV Chimera Vaccine Efficacy Test

challenge virus: WNV NY-99 dose 100 MLD₅₀ (420FFU)

* Mice survival (no. survival mice / no. tested)

Immunization Dose for Chimera virus (ffu/mouse)	10 ⁷	10 ⁶	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ²	10 ¹	1
ML17/WN 3-1	100 (5/5)	100 (5/5)	100 (5/5)	30 (4/5)	20 (1/5)	0 (2/5)	0 (0/5)	0 (0/5)
ML17/WN 3-2	100 (5/5)	100 (5/5)	100 (5/5)	100 (5/5)	50 (4/5)	30 (1/5)	0 (0/5)	0 (0/5)
ML-17	0 (0/5)	-	-	-	-	-	-	-

Negative control (MEM) 0 (0/5)

D. 結論

(1) 我々が試作したヒト用のウエストナイルウイルス不活化ワクチンの有効性がマウスを用いた実験で確認された。動物での安全性試験(局所刺激試験、催奇形性試験、毒性試験など)でも十分な安全性が確認された。

(2) 生ワクチンの開発については当教室の作出した日本脳炎ウイルスワクチン株とウエストナイルウイルスのキメラウイルスを用いて、マウスに対するキメラウイルスの神経毒性、神経侵襲性実験による弱毒化の確認およびワクチン効力試験による感染防御効果が実証された。

E. 考察

不活化ワクチンについては 2005 年日本においてもウエストナイル熱患者(海外感染例)が報告された状況から一刻も早い実用化のためヒトでの臨床試験を実施する必要がある。

キメラウイルスの生ワクチンについては若干の神経毒性が認められたので、今後その原因を探り、より安全性の高いキメラウイルスに改良する必要がある。さらに接種動物でのウイルス血症の有無、蚊への感染性の有無などより詳細な検討が必要である。

F. 健康危機管理情報

なし

G. 研究発表

1) 論文発表

Paresh Sumatilal Shah, Mariko Tanaka, Afjal Hossain Khana, Edward Gitau Matumbi Mathenge, Isao Fuke, Mitsuo Takagi, Akira Igarashi, Kouichi Morita. Molecular characterization of attenuated Japanese encephalitis live vaccine strain ML-17. *Vaccine* Vol.24 402- 411, 2006.

Wei-Feng Tang, Yuki Eshita, Masayuki Tadano, Kouichi Morita and Yoshihiro Makino.

Molecular basis for adaptation of a chimeric dengue type4/Japanese encephalitis virus to vero cells. *Microbiol. Immunol.*, Vol.49:285-294, 2005.

Manmohan Parida, Kouhei Horioka, Hiroyuki Ishida, Paban Kumar Dash, Parag Saxena, Asha Mukul Jana, Mohammed Alimul Islam, Shingo Inoue, Norimitsu Hosaka, and Kouichi Morita. Rapid Detection and Differentiation of Dengue Virus Serotypes by a Real-Time Reverse Transcription-Loop-Mediated Isothermal Amplification Assay. *J. Clin. Microbiol.* Vol.43: 2895-2903, 2005.

Celia C. Carlos, Kazunori Oishi,* Maria T. D. D. Cinco, Cynthia A. Mapua, Shingo Inoue, Deu John M. Cruz, Mary Ann M. Pancho, Carol Z. Tanig, Ronald R. Matias, Kouichi Morita, Filipinas F. Natividad, Akira Igarashi, And Tsuyoshi Nagatake. Comparison of Clinical Features and Hematologic Abnormalities Between Dengue Fever and Dengue Hemorrhagic Fever Among Children in the Philippines. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, Vol.73, 435- 440,2005.

Fuxun Yu, Mai Quynh Le, Shingo Inoue, Hong Thi Cam Thai, Futoshi Hasebe, Maria del Carmen Parquet, Kouichi Morita. Evaluation of Inapparent Nosocomial Server Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Infection in Vietnam by use of Highly Specific Recombinant Truncated Nucleocapsid Protein-Based Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology.* Vol.12, 848-854, 2005.

Leonora T.D. Salda, Maria D.C.Parquet, Ronald R. Matias, Filipinas F. Natividad, Nobuyuki Kobayashi, Kouichi Morita. Molecular Epidemiology of dengue 2 viruses

in the Philippines: Genotype shift and local evolution. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* Vol. 73, 796-802, 2005

Nawa M., Takasaki T., Ito M., Inoue S., Morita K., and Kurane I. Immunoglobulin A Antibody Responses in Dengue Patients: a Useful Marker for Sero diagnosis of Dengue Virus Infection. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*. Vol. 12, 1235-1237, 2005.

森田公一:「デング熱、デング出血熱」、今日の治療指針 2005, p143, 2005.

森田公一:「国際感染症、日本脳炎」、臨床看護、Vol. 31, 169-172, 2005.

森田公一:「西ナイル熱・脳炎 - 最近の動向」、長崎市医師会報、Vol. 39, 14-16, 2005

森田公一:「バイオセーフティ」 in 標準微生物学 (第9版)、山西弘一 監修、医学書院、2005

森田公一:「ウエストナイル熱に対するワクチン」臨床とウイルス、Vol. 33, 28-32. 2005

森田公一:「ウエストナイル熱」モダン フィジシャン、Vol. 25, 523-526. 2005.

森田公一:「ウエストナイル熱とワクチン開発の現状」感染症、Vol. 35, 91-96. 2005.

森田公一:「フラビウイルスによる疾患 (ウエストナイル熱、デング熱を中心に)」カレントセラピー、Vol. 27, 722-724, 2005.

森田公一:「ウエストナイル脳炎」、*Infectious Disease Report* 2005, No28, 2005.

森田公一:「ウエストナイルウイルス」、*Drug*

Delivery System. Vol. 20(5). 556-557, 2005.

森田公一:「西ナイル熱の現状」、*Medical Science Digest* Vol. 31(14). 548-549, 2005

2) 学会発表

国際会議における発表

Morita K.: Arboviral encephalitis infection in Asia: The Old and the New. *German-Japanese Symposium on Emerging and re-emerging viruses (Toyama, Japan, May 14-17, 2005)*

国内会議における発表

Afjal Hossain Khan, 福家 功, 石川 豊数, 井上 真吾, 森田 公一: 西ナイルウイルスに対する弱毒生ワクチン開発の試み. 第40回日本脳炎ウイルス生態学研究会・神奈川県 箱根, 2005年5月26-27日

Maria del Carmen Parquet, Phan Thi Nga, Manmohan Parida, Nguyen Thanh Thuy, Pham Thi Suu, Afjal Hossain Khan, Leonora T. D. Salda, Fuxun Yu, Shingo Inoue, Takashi Ito, Kouichi Morita: Novel Arbovirus in Vietnam: Isolation, Identification and Molecular Characterization. 第42回日本ウイルス学会九州支部総会・沖縄, 2005年7月8-9日

Afjal Hossain Khan, 福家 功, 石川 豊数, 井上 真吾, 森田 公一: 西ナイルウイルスに対する弱毒生ワクチン開発の試み. 第42回日本ウイルス学会九州支部総会・沖縄, 2005年7月8-9日

Fuxun Yu, Nor Shahidah Khairullah, Shingo Inoue, Vijayamalar Balasubramaniam, Futoshi Hasebe, Kouichi

Morita : Expression of Nipah virus nucleocapsid protein in *Escherichia Coli* and its application in sero-diagnosis. 第 42 回日本ウイルス学会九州支部総会・沖縄, 2005 年 7 月 8-9 日

Salda Leonora Trinidad Demot, Maria Del Carmen Parquet, Ronald R. Matias, Filipinas F. Natividad, Noboyuki Kobayashi, Kouichi Morita : Molecular epidemiology of dengue virus serotype 2 in the Philippines. 第 46 回日本熱帯医学会大会・京都, 2005 年 10 月 14-15 日

井上真吾, Nemani Talemaitoga, Aryati, Mohammed A. Islam, Efren M. Dimaano, Ronald R. Matias, Wimal Abeyewickreme, 大石和徳, Filipinas F. Natividad and 森田公一、第 12 回トガ・フラビ・ペスチ研究会 (平成 18 年 1 月 20 日、東京)

H. 知的財産権の出願・登録状況

ウエストナイルウイルス生ワクチン開発に関する特許を申請中である。

分担研究報告書

ウエストナイル不活化ワクチン及び日本脳炎不活化ワクチン免疫マウスにおける
ウエストナイルウイルスに対する防御能の検討

分担研究者：高崎智彦（国立感染症研究所ウイルス第一部）

協力研究者：林 昌宏（国立感染症研究所ウイルス第一部）

米国で1999年より流行しているウエストナイル熱・脳炎は北米大陸のほぼ全域から中米に至るまで拡大している。2005年には日本で初めてウエストナイル熱の輸入症例が報告された。ウエストナイル脳炎はひとたび発症するとその致死率は高く、回復しても重度の後遺症を伴う場合がある。またその治療法は確立されていないことからワクチン開発が急務である。そこで本研究において現在開発中のVero細胞由来ウエストナイル不活化ワクチンを免疫したマウスを用いてウエストナイルウイルス攻撃実験を行い、その効果を検討した。その結果ウエストナイル不活化ワクチン免疫マウスにおいては100%の生存率を示しウイルス血症も観察されなかった。それに対してコントロール群においては低い生存率を示し、高いウイルス血症が観察された。これらの結果から現在米国で流行しているウエストナイルウイルスに対するウエストナイル不活化ワクチンの有効性が示唆された。

A.研究目的

ウエストナイルウイルスはフラビウイルス科フラビウイルス属の、エンベロープを有する直径40-50nmの一本鎖RNAウイルスである。ヒトにウエストナイル熱/脳炎を起こす。1999年にニューヨークで発生したウエストナイル熱/脳炎は北アメリカ大陸およびカリブ海地域のほぼ全域に拡大し南米のコロンビアにおいても血清学的にその存在が確認されている。現在もその流行が終息する気配はなく、我が国においても米国渡航者による輸入症例が2005年に報告され、よりいっそうの警戒が必要になっている。ウエストナイル脳炎はひとたび発症するとその致死率が

高く、回復しても重度の後遺症を伴う場合が多い。現在ウマ用ウエストナイル不活化ワクチンおよびDNAワクチンが米国で認可されているがヒト用ワクチンはない。したがってヒト用ウエストナイルワクチンの開発が急務である。そこで本研究では現在開発中の組織培養ウエストナイル不活化ワクチン免疫マウスにおけるウエストナイルウイルスに対する防御能の検討をウエストナイルウイルス攻撃試験により行った。

B.研究方法

ウイルスと培養細胞：ウエストナイルウイルス

ス攻撃実験においてはウエストナイルウイルスNY99-6922株を用いた。ウエストナイルウイルス力価測定にはサル腎由来のVero細胞を用いた (American Type Culture Collection)。

マウス：ウエストナイルウイルスに対する防御能の検討において比較的フラビウイルスの感受性が高いことが知られている 4 週齢 C3H/He マウス (体重 10-12 g) (チャールス・リバー) を用いた。コントロール群においても同様のマウスを用いた。

ウイルス力価測定：ウエストナイルウイルスの力価を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、3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。

LD₅₀の算定：1群5匹、5群のマウスそれぞれにウエストナイルウイルスNY99-6922株を10倍階段希釈し、腹腔内接種にて感染させた。ウエストナイルウイルス感染マウスを21日間観察し、Reed & Muench法にてLD₅₀を算出した。

ウエストナイルウイルス攻撃試験：Vero細胞由来ウエストナイル不活化ワクチンを3週齢のC3H/Heマウス (♀) に1週間隔で2回免疫し免疫4週後にWNV NY99-6922株を用いて攻撃実験を行い、その後マウスを21日間観察した。攻撃実験はそれぞれ100LD₅₀/dose及び1LD₅₀/doseのウイルス量にて行った。対照として日本脳炎不活化ワクチン (JEワクチン) 免疫マウス群及び非免疫群を用意した。

TaqMan-PCR：マウス血液からHigh Pure

Viral RNA kit (ロシュ)を用いてRNAを抽出した。TaqMan-PCRの反応には精製・抽出したウイルスRNA 5 μ lに対して50 pmolのフォワードプライマーおよびリバースプライマー、10 pmolのプローブさらにTaqMan RT-PCR Ready Mix Kit (PE Applied Biosystems)を加え最終容量50 μ lで行い、ウエストナイルウイルス特異的な遺伝子断片の増幅を観察した。また10³-10⁹のウエストナイルウイルスRNAスタンダードを用意し、それぞれの検体中のウイルスRNAコピー数を算出した。

遺伝子配列解析：遺伝子配列解析は3100-Avant ジェネティック・アナライザー (ABI PRISM)を用いて行った。

電子顕微鏡観察：ウエストナイルワクチンを陰性染色し、透過型電子顕微鏡 (TEM) を用いて電子顕微鏡観察を行った。

C.研究結果

電子顕微鏡観察：ウエストナイルワクチンの電子顕微鏡観察を陰性染色で行ったところ直径約 50nm のウイルス粒子が良く保存されている像が観察された (図 1)。

LD₅₀の算出：C3H/He マウスのウエストナイルウイルス NY99-6922 株に対する 1LD₅₀ は 1.3×10^1 PFU であることが明らかとなった。またこのとき含まれるウエストナイルウイルス RNA のコピー数は 8.0×10^1 コピーであることが示された。

ウエストナイルウイルス攻撃実験：ウエストナイル不活化ワクチン免疫マウスにおいては1LD₅₀ 及び 100LD₅₀、両 WNV 攻撃群ともに生存率 100%を示し (図 2. A, B)，ウイルス血症も観察されなかった (図 3. B, E)。JE ワクチン免疫及び非免疫コントロール群に