

においては多くの個体において高いウイルス血症が観察されたが、生存マウスにおいては多くの場合ウイルス血症が観察されず、ウイルス血症が観察された個体においても血中ウイルスの迅速な排除が観察された。(図3. A, C, D, F) また JE ワクチン免疫マウスにおいて 1LD₅₀ WNV 攻撃群では 40% の生存率を、100LD₅₀ WNV 攻撃群では 30% の生存率が観察された(図2. A, B) .

D. 考 察

マウスを用いた感染実験の結果、ウエストナイル不活化ワクチン免疫群にはウイルス血症も観察されずいずれの群においても 100% の防御率を示したためウエストナイル不活化ワクチンは WNV NY99 株の防御に有効であることが示唆された。しかしながら、日本脳炎不活化ワクチン免疫群においては 100% の生存率は示さずその効果は部分的なものにとどまり WNV NY99 株に対して十分な防御能を示さなかった。

従ってウエストナイル不活化ワクチンは現在米国を中心に流行しているウエストナイル熱・脳炎の予防において有効であることが示唆された。

E. 結 論

本実験において Vero 細胞由来ウエストナイル不活化ワクチンの現在米国を中心に流行しているウエストナイル熱・脳炎に対する有効性が示唆された。米国では 2005 年度も 2000 人以上の患者が報告されている。またロシアにおける患者の発生地域も東進しており、ウエストナイルウイルスの活動地域はウラジオストックに達している。ウエストナイルウイルスの動向には鳥、蚊、気候、環境等

の要因が複雑に関わり、その状況の予測は困難であるためウエストナイルウイルスの我が国への侵入は予断を許さない。したがってワクチンの開発が急務であり、今後もよりいっそうのウエストナイル不活化ワクチンの検討が必要である。

F. 健康危険情報

な し

G. 研究発表

1. 論文

小泉加奈子, 中島由紀子, 松崎真和, 小井戸則彦, 大曾根康夫, 林 昌宏, 高崎智彦, 倉根一郎, 秋月哲史. 本邦で初めて確認されたウエストナイル熱の輸入症例. 感染症学雑誌 80(1):56-57 (2006)

林 昌宏, 倉根一郎: ウエストナイルウイルス. 日本臨床, 63 増刊号 7: 321-323 (2005)

林 昌宏, 高崎智彦: フラビウイルス脳炎-ウエストナイルウイルスを中心に-. 臨床病理, 53(8) : 721-727 (2005)

林 昌宏, 高崎智彦: ウエストナイル熱/脳炎. 遺伝, 59(5) : 37-42 (2005)

林 昌宏, 倉根一郎: ウエストナイルウイルスに関する最新の知見と対策. 山口獣医学雑誌, 32 : 1-12 (2005)

2. 学会発表

C. Lim, T. Takasaki, A. Kotaki, R. Nerome, M. Ito, S. Tajima, K. Morita, T. Ishikawa, I. Kurane. Mouse Antibody Response to

Inactivated West Nile and Inactivated Japanese Encephalitis Vaccines for Immunization against West Nile virus and other Flaviviruses. 2006 National Conference on West Nile Virus in the United States (San Francisco) 2006/2/23-24

林 昌宏, 高崎智彦, 小滝 徹, 根路銘令子, 伊藤美佳子, 田島 茂, 森田公一, 石川豊数, 倉根一郎. ウエストナイル不活化ワクチンの日本脳炎血清型群ウイルスに対する交差反応の検討. 第53回日本ウイルス学会総会(横浜市) 2004/11/20-22

濱野正敬, 林 昌宏, 高木弘隆, 澤邊京子, 桑山 勝, 岸 昇, 高崎智彦, 倉根一郎. 広島県内の野生イノシシにおける日本脳炎ウイルスに対する抗体保有状況. 第141回日本獣医学会学術集会(つくば市) 2006/3/18-20

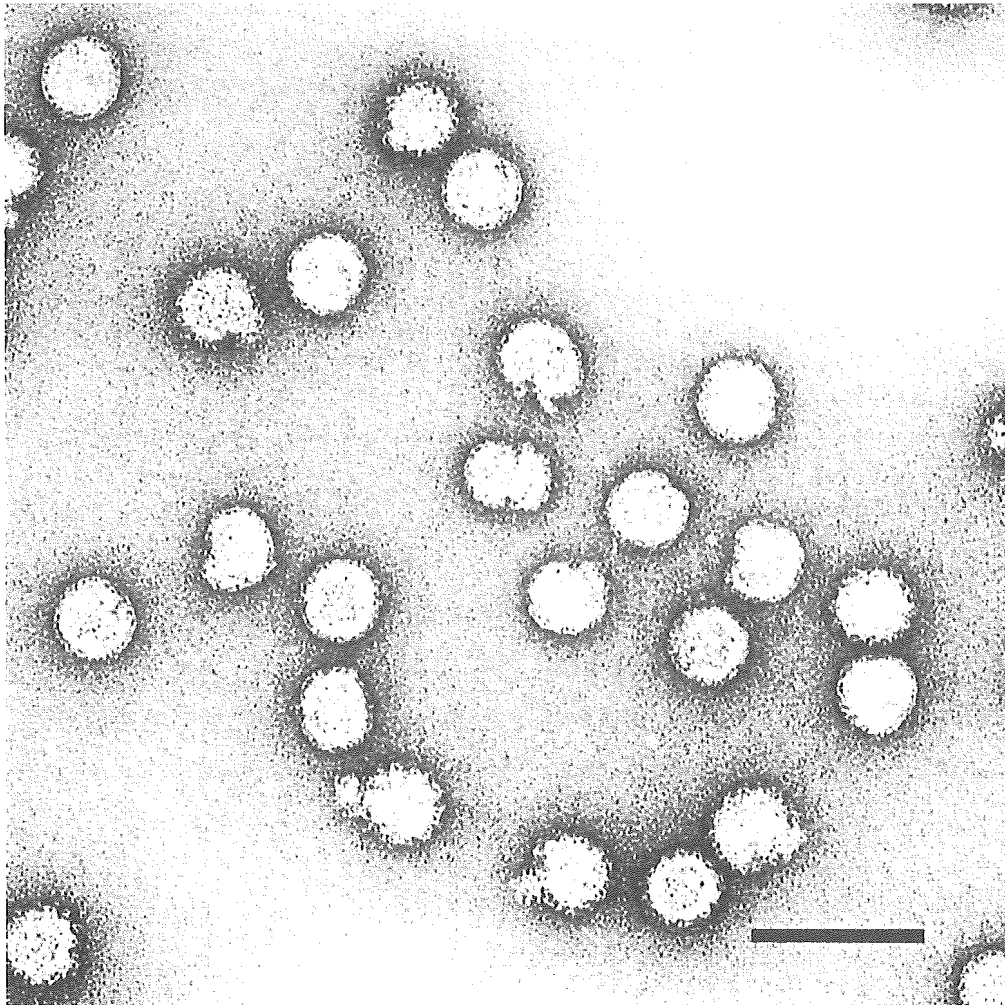


図1. Vero 細胞由来ウエストナイル不活ワクチンの電子顕微鏡像 : Bar は 100nm を示す.

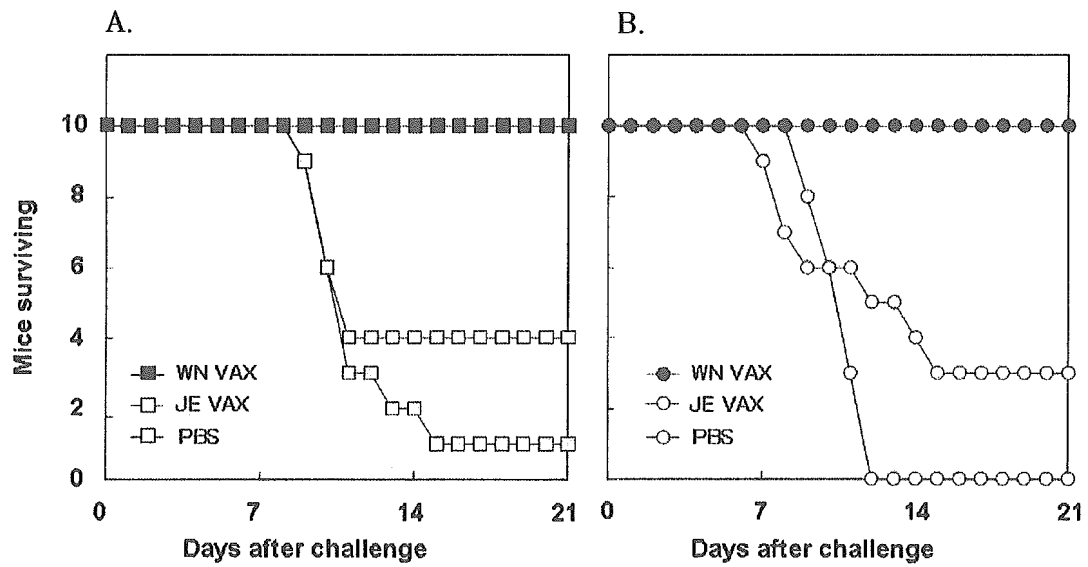


図2. ウエストナイルウイルス NY99-6922 株攻撃試験における生存マウス数：ウエストナイルウイルス攻撃後の生存マウス数を示す。(A) 1LD₅₀ ウエストナイルウイルス攻撃実験の結果を示す。■はウエストナイルワクチン免疫群□は日本脳炎ワクチン免疫群□はコントロール群である。(B) 100LD₅₀ ウエストナイルウイルス攻撃実験の結果を示す。●はウエストナイルワクチン免疫群○は日本脳炎ワクチン免疫群○はコントロール群である。

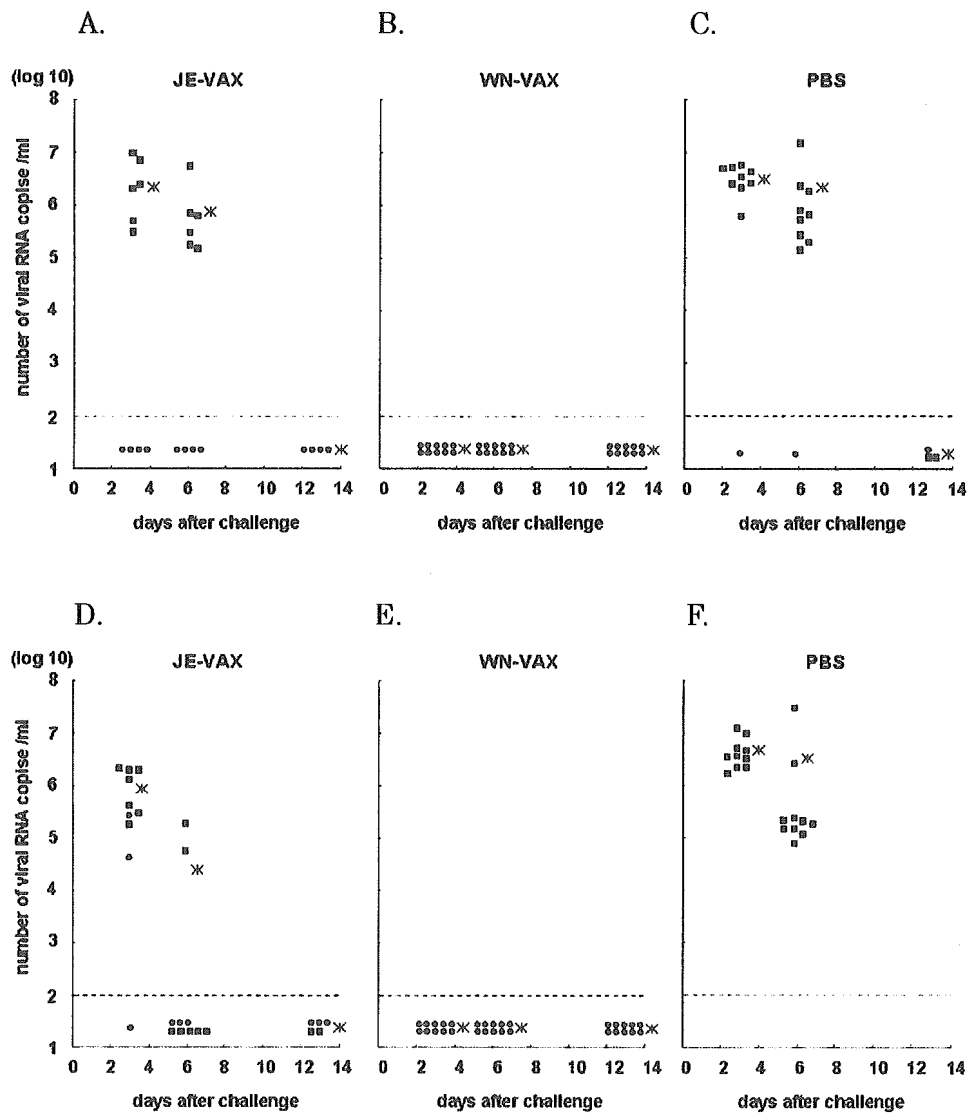


図3. ウエストナイルウイルス攻撃試験におけるマウス血中のウエストナイルウイルス RNA 量の経時的変化：●は生存マウスを■は死亡マウスを✱は1群マウス血清中の RNA コピー数の平均を表す。1LD₅₀ ウエストナイルウイルス攻撃試験における日本脳炎ワクチン免疫マウス (A), ウエストナイルワクチン免疫マウス (B), コントロールマウス (C), 100LD₅₀ ウエストナイルウイルス攻撃試験における日本脳炎ワクチン免疫マウス (D), ウエストナイルワクチン免疫マウス (E), コントロールマウス (F) の血中のそれぞれの個体におけるウエストナイルウイルス RNA 量の経時的変化を示す。

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

遺伝子組換えを用いたウエストナイルウイルスサブユニットワクチンの開発

分担研究者 小島朝人 国立感染症研究所 感染病理部
研究協力者 高橋秀宗 国立感染症研究所 感染病理部
田中道子 国立感染症研究所 感染病理部
前田才恵 国立感染症研究所 感染病理部

研究要旨：ウエストナイルウイルス（WNV）ワクチン抗原開発のために、中和抗体を誘導するウイルス様粒子（VLP）抗原産生細胞作製を目的とした。日本脳炎ウイルス（JEV）及び JEV VLP の研究より、VLP の産生には E と PrM 蛋白、さらに C 蛋白 C 末端のシグナルシーケンスが不可欠であることが判明している。本年度は、WNV PrM の上流に配置するシグナルシーケンスについて、粒子産生の効率化という観点から解析した。その結果、シグナルシーケンスが粒子産生効率に大きな影響を与えること、かつ、そのアミノ酸配列長には規則性のあることが判明した。構築された PrM-E cDNA の中で最も発現効率の高い cDNA から産生された WNV VLP は、平衡蔗糖密度勾配遠心法で比重 ρ 1.19 の画分に単一のピークを示した。VLP 抗原産生細胞株樹立の基盤を確立できたものと思われる。

A. 研究目的

ウエストナイルウイルス（WNV）ワクチン抗原開発のために、中和抗体を誘導するウイルス様粒子（VLP）抗原産生細胞作製を目的とした。本年度は、WNV PrM の上流に配置するシグナルシーケンスについて、粒子抗原産生の効率化という観点から解析をすすめた。

B. 研究方法

NY99 株からの cDNA のクローニング：

(ア) 試料より RNA を調整し、逆転写酵素反応、PCR により cDNA を合成しプラスミドへクローニングした。

(イ) cDNA のシーケンスを確認した。

VLP 発現プラスミドの構築：

(ア) 上記プラスミドからプライマーを組み合わせて PCR を行った。コア蛋白の第 1

アミノ酸を 1 とした。発現開始点を 98 番目から 109 番目のアミノ酸まで一つずつずらし、翻訳開始コドンを加え、E 蛋白の C 末 791 番目のアミノ酸までを cDNA として作製した(図 1)。これら cDNA をそれぞれ哺乳類細胞発現ベクターへサブクローニングした。さらに、PrM 蛋白の中間(図 1、#7)、及び、M 蛋白の N 末付近(図 1、#8)から E 蛋白の C 末 791 アミノ酸までを発現するプラスミドも作製した。

発現抗原の解析：

(ア) E 蛋白に対するモノクローナル抗体 402 及び HRP でラベルした 402 を用いて E 蛋白のエピトープを複数有する分子の ELISA 定量系を準備した。この ELISA では TritonX-100 を加えることにより E 蛋白の検出が不能になることから、粒子構

造の E 蛋白を認識すると考えられる。

- (イ)各プラスミドを 293T 細胞へ導入し上清中の E 蛋白を ELISA によって定量した。
- (ウ)上清を 100,000 x g で超遠心し、ペレットを抗-JEV 抗体及び抗-M 抗体によりウエスタンプロット解析した。
- (ウ)プラスミドを導入した細胞内蛋白も同様にウエスタンプロット解析した。
- (エ)上清へ蛋白を産生しないクローン(図 1、#4)ではシグナルシーケンスのアミノ酸長を一つ増やした発現プラスミドを製作し、上清の蛋白産生の変化を調べた。

細胞内局在の解析：

- (ア)上清へ効率よく E 蛋白を放出する構築体(図 1、#6)及び産生しない構築体(図 1、#4)をそれぞれ EGFP と融合させ、細胞内での局在を調べた。

産生 E 蛋白の解析：

- (ア)効率よく E 蛋白を発現するプラスミド(図 1、#6)を 293T 細胞へ導入し上清 100 mL を超遠心した。
- (イ)ペレットを 20-60%平衡蔗糖密度勾配法によってフラクション中の E 蛋白を ELISA によって定量した。
- (ウ)最も E 蛋白を含むフラクションを濃縮し、ネガティブ染色後電子顕微鏡観察を行った。

(倫理面への配慮)

本研究では特に臨床試料等を使用しておらず、動物実験も行っていないため、該当事項なし。

C. 研究結果

- (ア)各発現プラスミドを 293T 細胞へ導入し、上清中の E 蛋白を定量したところ、シグナルシーケンスを構成するアミノ酸鎖長は規則的に産生蛋白量を調節していた(図 1)。
- (イ)PrM 蛋白の中間(図 1、#7)、或いは、M 蛋白の N 末近傍(図 1、#8)を開始点とす

る発現プラスミド導入では全く上清に E 蛋白を認めなかった。

- (ウ)cDNA を導入した細胞内蛋白のウエスタンプロットでは E、PrM、M 蛋白が検出された(図 2)。最も長いシグナルシーケンスを有する発現蛋白(図 1、#1)には PrM と E 蛋白の間の切断が認められなかった(図 2)。全く上清に E 蛋白を産出させないシグナルシーケンスを有するコンストラクト(図 1、#4)では E 蛋白が少なく、PrM 蛋白を認めなかった(図 2)。
- (エ)ELISA により抗原性が確認できた蛋白ではウエスタンプロットによっても E、PrM、M 蛋白を認めた(図 2)。
- (オ)上清に蛋白を産生させないシグナルシーケンス(図 1、#4)にアラニンを付加し発現させたところ、細胞内 PrM 蛋白が増加し、上清へ E 蛋白を効率良く産生するようになった。
- (カ)上清へ効率よく E 蛋白を産生させるシグナルシーケンス(図 1、#6)を有する融合蛋白は細胞室内のゴルジと考えられる器官へ集積していることが判明した。
- (キ)平衡蔗糖密度勾配法によって E 蛋白は比重約 1.19 を示すフラクションへ集積していた。
- (ク)ネガティブ染色によって直径約 25 nm の粒子構造を電子顕微鏡観察で認めた。

D. 考察

シグナルシーケンスが粒子産生効率に大きな影響を与えることが判明した。また、これを裏づけ、発現効率の高いシグナルを有する融合蛋白はゴルジと考えられる器官に集積した。シグナルシーケンス長と上清への E 蛋白放出効率との間には、7 アミノ酸周期の規則性があった。産生しないクローンのシグナルシーケンスへアミノ酸を一つ付加すると E 蛋白産生が回復したことから、アミノ酸の特異性よりもアミノ酸数を認識してゴルジへの取り込みを促進する機構があ

ると考えられた。

上清への E 蛋白産生と細胞内での PrM 蛋白発現は一部一致しないクローンがあった。粒子中には PrM、M を必ず認めたことから粒子中へ PrM が取り込まれることが出芽には必須であると考えられた。

上清への発現効率の高い蛋白は 20-60% 平衡蔗糖密度勾配遠心法で比重 \approx 1.19 の画分に単一のピークを示した。また、電子顕微鏡で粒子様構造が観察されたことも、産生された蛋白が粒子を形成していることを示唆した。

これらのことから、VLP 抗原産生細胞株樹立の基盤を確立できたものと思われる。

E. 結論

シグナルシーケンスが粒子産生効率に大きな影響を与えること、かつ、そのアミノ酸配列長には周期規則性のあることが判明した。構築された PrM-E cDNA の中で最も発現効率の高い cDNA から産生された WNV E、PrM、M 蛋白は、平衡蔗糖密度勾配遠心法で比重 \approx 1.19 の画分に単一のピークを示した。VLP 抗原産生細胞株樹立の基盤を確立できたものと思われる。

F. 健康危険情報

該当事項なし

G. 研究発表

1. 論文発表

該当事項なし

2. 学会発表

該当事項なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 該当事項なし

2. 実用新案特許 該当事項なし

3. その他 該当事項なし

図1 シグナルシーケンス長を変えたPrE/E発現プラスミドの構築と上清中のE蛋白の定量 (#6を100%として表示した。)

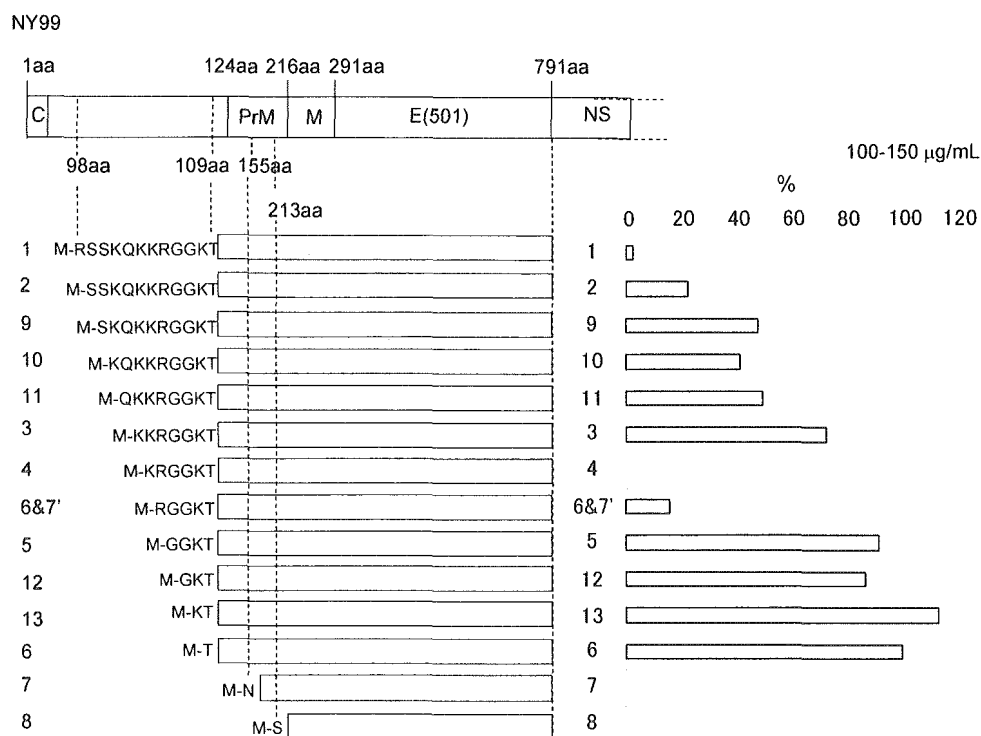
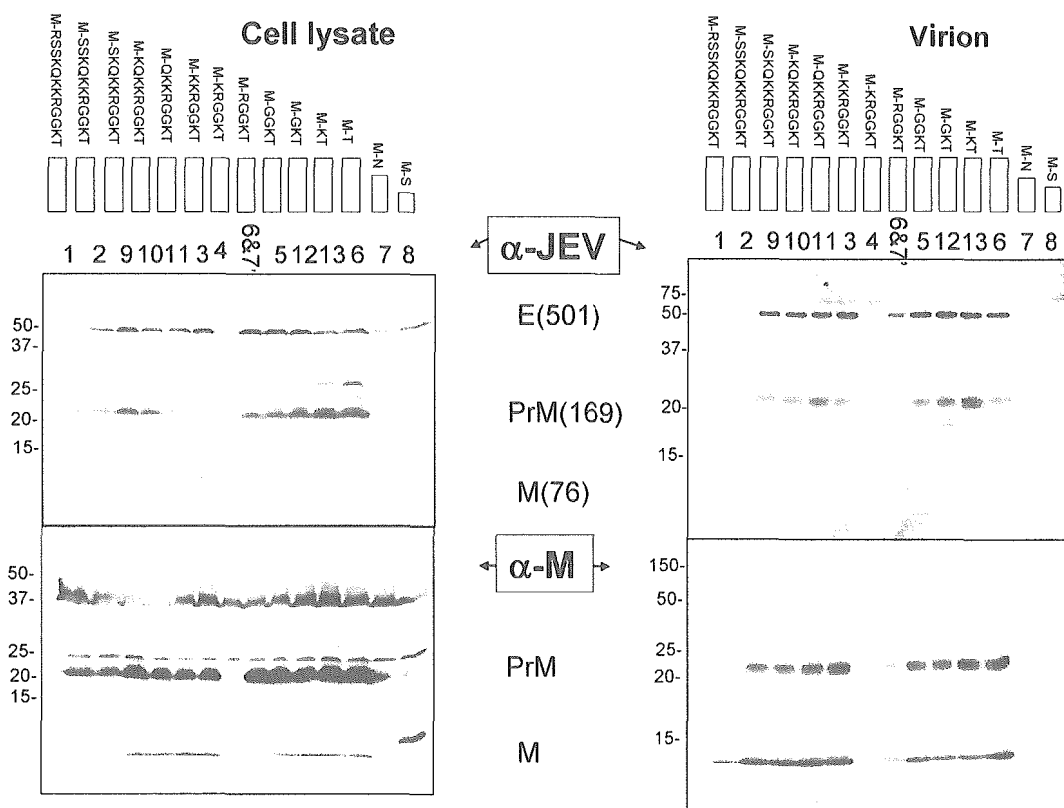


図2 発現プラスミド導入細胞と培養上清の超遠心ペレット(virion)のウエスタンブロット



分担研究報告書

ウエストナイルワクチン用アジュバントの開発に関する研究

分担研究者：森 康子 医薬基盤研究所・感染制御プロジェクト・プロジェクトリーダー

研究要旨

ウエストナイルウイルス侵入に備えての予防対策にはワクチン開発が必須であると考えられる。製造過程の簡便性、病原体取り扱いレベルを考慮すると効果的かつ安全なサブユニットワクチンの開発が望まれる。また、その効果を増強させるためにも安全かつ効果的なアジュバントの併用が理想的であり、その開発も必要である。

今回、我々は、現行の不活化日本脳炎ワクチンおよび日本脳炎ウイルス Virus-Like Particles (VLP) を用いて、VLP のワクチンとしての可能性およびアジュバントの必要性の有無に関する検討を行った。

不活化日本脳炎ワクチンあるいは VLP (アジュバント併用の有無) をマウスに接種することによって

誘導される各々の抗体応答をマウス血清中における日本脳炎ウイルスに対する中和抗体価を測定することによって調査した。VLP 単独接種マウス群での中和抗体価は、不活化日本脳炎ワクチン接種マウス群のそれに比較し、やや低値を示したが、アジュバント併用 (アルミアジュバント) VLP 接種マウス群では、不活化日本脳炎ワクチン接種マウス群とほぼ同等の抗体応答を得ることができた。

以上の結果より、製造過程の簡便性、病原体取り扱いレベルを考慮すると、アジュバント併用 VLP のワクチンとしての可能性が考えられた。

分担研究者；森 康子
医薬基盤研究所・感染制御プロジェクト・プロジェクトリーダー

協力研究者；吉井洋紀、山西弘一 (医薬基盤研究所)、
小島朝人 (国立感染症研究所)、
石川豊教 (財団法人阪大微生物病研究会)

A. 研究目的

Virus-Like Particles (VLP) を用いたワクチン応用は、製造過程、病原体取り扱いレベル、低コストなどの観点より考慮すると望まれるべき開発法である。また、ワクチン効果を増強する手段としてのアジュバント併用は、一般的に非常に有効であることが示唆されている。我々は、VLP のワクチンとしての可能性およびアジュバント併用投与の効果を現行の不活化日本脳炎 (JE) ワクチンおよび日本脳炎 VLP を用いて検討した。

B. 研究方法

不活化日本脳炎 (JE) ワクチン、日本脳炎ウイルス Virus-Like Particles (VLP) [アルミアジュバント (+) または (-)] をマウスに投与することによって各々が誘導する中和抗体価を比較検討した。

(材料)

マウス脳由来不活化 JE ワクチン原液 (たん白質量

95.3 $\mu\text{g/mL}$)、VLP (ホルマリン (-) 及びホルマリン (+)、たん白質量 24.5 $\mu\text{g/mL}$ 、ホルマリン (-)、ホルマリン (+) と)、水酸化アルミニウムゲル、BALB/c マウス (雌・4 週齢)

(方法)

マウス 3 匹を 1 群として下記の抗原量を 7 日間隔で 2 回腹腔内投与した。2 回目の投与後 7 日で採血し、血清を分離・非働化して抗日本脳炎ウイルス中和抗体価を測定した。中和抗体価の測定には、北京株を用いた。

抗原量：

試験-1

- 1) 不活化日本脳炎ワクチン原液 10 μg /匹
- 2) 不活化日本脳炎ワクチン原液 5 μg /匹
- 3) VLP ホルマリン (+) 10 μg /匹
- 4) VLP ホルマリン (+) 5 μg /匹
- 5) VLP ホルマリン (+) 10 μg +水酸化アルミニウムゲル 300 μg /匹
- 6) VLP ホルマリン (+) 5 μg +水酸化アルミニウムゲル 300 μg /匹
- 7) VLP ホルマリン (+) 10 μg +水酸化アルミニウムゲル 100 μg /匹
- 8) VLP ホルマリン (+) 5 μg +水酸化アルミニウムゲル 100 μg /匹
- 9) VLP ホルマリン (-) 10 μg /匹

10) PBS(-)

試験-2

- 1) 不活化日本脳炎ワクチン原液 1 μ g/匹
- 2) 不活化日本脳炎ワクチン原液 0.5 μ g/匹
- 3) VLP ホルマリン (+) 1 μ g/匹
- 4) VLP ホルマリン (+) 0.5 μ g/匹
- 5) VLP ホルマリン (+) 1 μ g+水酸化アルミニウムゲル 300 μ g/匹
- 6) VLP ホルマリン (+) 0.5 μ g+水酸化アルミニウムゲル 300 μ g/匹
- 7) VLP ホルマリン (+) 1 μ g+水酸化アルミニウムゲル 100 μ g/匹
- 8) VLP ホルマリン (+) 0.5 μ g+水酸化アルミニウムゲル 100 μ g/匹
- 9) VLP ホルマリン (-) 1 μ g/匹

10) PBS(-)

(倫理面への配慮)

動物実験の倫理面においては、動物愛護と動物福祉の観点から十分な配慮を行った。本動物実験は、医薬基盤研究所の動物実験委員会において審査を受け、承認を得ている。

C. 研究結果 (図1、2)

- (1) VLP 単独投与群の平均中和抗体価は、不活化 JE ワクチン投与群のそれに比較するとやや低値を示した。
- (2) アルミアジュバントを混合投与した VLP 投与群の平均中和抗体価は、不活化 JE ワクチン投与群のそれとほぼ同等の値を示した。

- (3) VLP の中和抗体誘導能が認められたが、アルミアジュバントを混合することによって、より効果的な免疫を誘導する可能性が示唆された。

D. 考察

VLP 単独投与群においても中和抗体が誘導されたことより、VLP のワクチンとしての有用性が示唆された。しかし、現行の不活化 JE ワクチン投与群で得られた中和抗体価と比較するとやや低値を示したことから、免疫誘導能は、不活化 JE ワクチンに比較するとやや低い可能性が考えられた。VLP にアルミアジュバントを併用し、投与を行った群では、不活化 JE ワクチン投与群とほぼ同等の中和抗体価が誘導された。本研究結果より、VLP 単独投与においても中和抗体の誘導が期待できるが、VLP にアジュバントを併用し、投与するのが理想的ではないかと考えられた。

以上より、製造過程の簡便性、病原体取り扱いレベルを考慮すると、アジュバント混合 VLP のワクチンとしての可能性が考えられた。今後は、各群における個体数を増やし、さらに効果を検討していきたいと考える。また、現行のアルミアジュバントと比較し、より安全で効果的なアジュバントの探索を行う予定である。

健康危険管理情報

なし

図1.

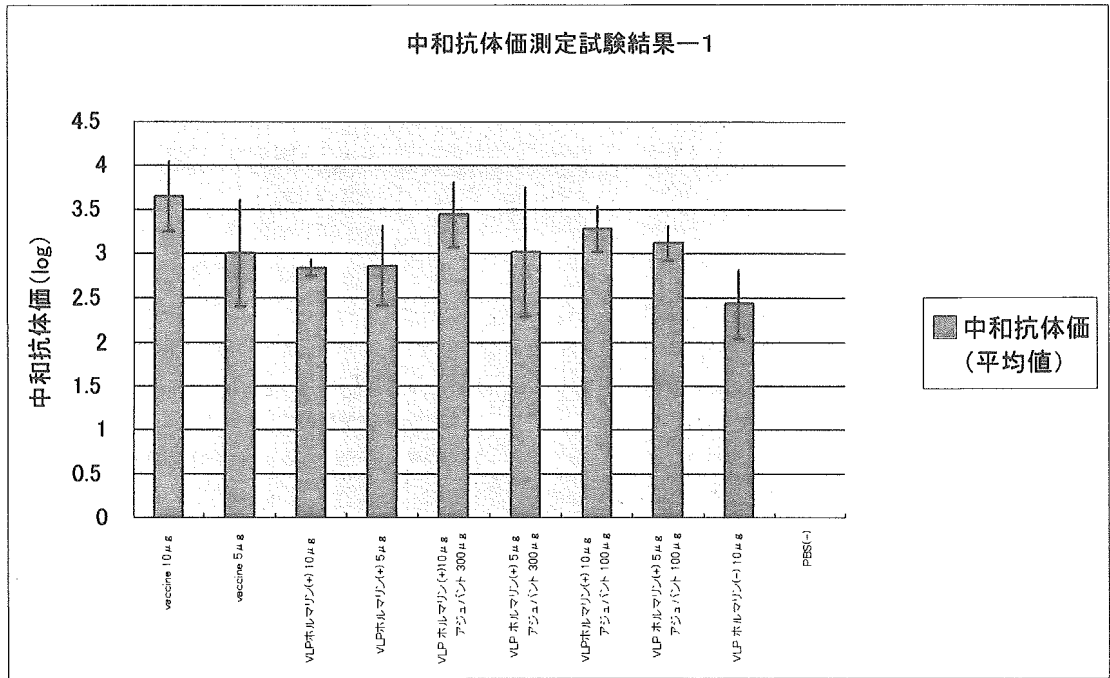
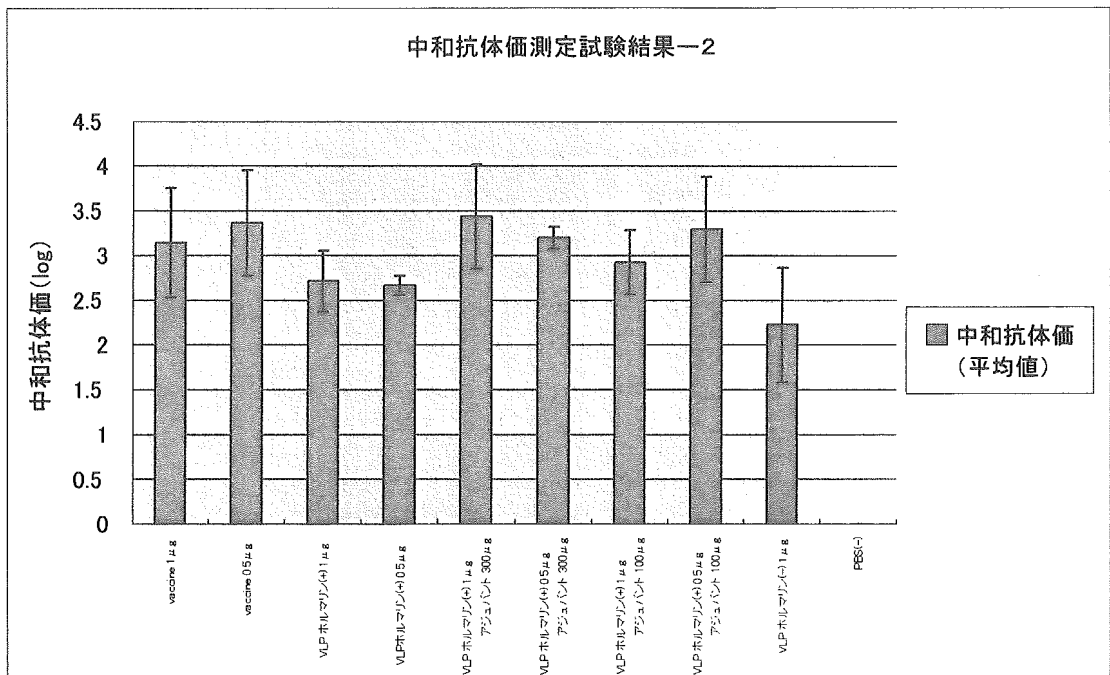


図2.



治療法開発のためのウイルス高病原性機序の解明

分担研究者 佐多徹太郎 (国立感染症研究所感染病理部)
研究協力者 岩田奈織子、永田典代、長谷川秀樹、原嶋綾子、波多野焜持、
尾崎泰子、佐藤由子 (同感染病理部)

研究要旨 ウエストナイルウイルス(WNV)と日本に存在する日本脳炎ウイルス(JEV)は血清学的に近縁で鑑別が難しい。日本に WNV が侵入した場合に備えて、WNV 感染臨床検体の病理学的診断法を確立するため、免疫組織化学法を行い JEV との交差性を示さない WNV 特異的抗体を調べた。その結果、調べた抗体は WNV に特異的であり、病理学的診断法に使用できることが分かった。また、WNV 動物モデルとの病態比較のために JEV 動物モデル作製を試み、BALB/c マウスで JEV 感染実験を行った。JEV 感染マウスはヒトの JEV 感染例と同じ病変を現し、JEV 感染マウスモデルとして使用できることが分かった。

A. 研究目的

WNV 熱・脳炎は現在、日本への侵入は認められていない。しかし、このウイルスに高感受性を示すトリや蚊は日本にも存在していることから、万が一、WNV が日本に侵入した場合に備える必要がある。日本には WNV と血清学的に近縁な JEV が存在しており、それとの鑑別が難しい。そこで WNV の臨床検体の病理学的診断法確立および WNV による神経病変機序の病理学的解析、そして WNV 熱・脳炎の病態解明のための動物モデルの作製を目的とした。

B. 研究方法

臨床検体の病理学的診断法の確立

(1)免疫組織化学法

すでに利用可能な、あるいは作製した 4 種類の抗 WNV 抗体 (Chemicon-8150, Chemicon-8151, WNV10, WNV11。全てモノクローナル抗体)と 2 種類の抗 JEV 抗体 (モノクローナル抗体とウサギ抗体)について、WNV 感染患者の脳組織と作製した JEV 感染マウスの脳組織を用いて、免疫組織化学法を行った。

(2)real-time PCR 法

文献(Sirato K *et al.*, JVM, 2005, 126,

119-125)で報告されている core protein をターゲットとする WNV と JEV のプライマーおよびプローブを作製した。そして、プライマーセットの感度を確認するため、 10^5 ~ 10^1 コピーに調整した WNV および JEV ゲノムを組み込んだプラスミドを用いてそれぞれ real-time PCR を行った。

プライマーセットおよびプローブ

WNV (Amplicon: 76 bp)

Forward: 5'-GCACGAAGATCTCGATGTCTAAG-3'

Reverse: 5'-ATTCCGCGTTTTAGCATATTGAC-3'

Probe: 5'-6FAM-ACCAGGAGGGCCCGG-3'MGB

JEV (Amplicon: 75 bp)

Forward: 5'-AGAACGGAAGAYAACCATGACTAAA-3'

Reverse: 5'-CCGCGTTTCAGCATATTGAT-3'

Probe: 5'-6FAM-ACCAGGAGGGCCCGG-3'MGB

動物モデルの作製

JEV 動物モデル

JEV (Beijing または JaTH160 株)を 6-8 週齢の BALB/c マウスに腹腔内、静脈内、皮下接種し、21 日間経過を観察した。臨床症状が発生

した個体についてはその時点で過麻酔による安楽殺を行い、心臓採血後に10%緩衝ホルマリンで還流固定し、脳、脊髄を中心に種々の組織を採材した。ホルマリン固定組織は型のごとくパラフィンに包埋した。パラフィン切片を作製し、HE染色と脳、脊髄についてはKB染色も行った。そして全組織について、抗JEV抗体を用いた免疫組織化学を行った。

(倫理面への配慮)

動物実験は国立感染症研究所動物実験委員会の審査後に承認を受けて行われた。

C. 研究結果

(1) 免疫組織化学法(表1)

抗JEV抗体はWNVと交差反応を示したが、抗WNV抗体は全てJEVの症例と交差反応性を示さず、WNVに特異的な抗体であることが確認された。

表1. 免疫組織化学法の結果

抗体	WNV		JEV
	ヒト	ヒト	マウス
JE(monoclonal)	+	+	+
JE(polyclonal)	NA	NA	+
WNV(8150)	+	-	-
WNV(8151)	+	-	-
WNV10	+	-	-
WNV11	+	-	-

(2) real-time PCR法

作製したプライマーセットを用いたreal-time PCRはWNVおよびJEVそれぞれのプラスミドに対し、10コピーのゲノム検出が可能であった(図1)。プライマーセットはそれぞれのウイルスゲノムに特異的で、感度の高いものであることが分かった。

(3) マウスへのJEV接種実験

マウスのJEV感染実験では、接種7日目から体重減少、立毛、目やになどの症状が見られ、一部の個体では突然発作を起こし、痙攣、

横臥するものもあった。9-14日目には沈鬱、瀕死となった。この症状は接種経路による違いはなかったが、発症は静脈内、腹腔内、皮下接種の順に現れた。発症したマウスの脳、脊髄では神経の急性壊死、グリオシスおよび単核系細胞を中心とする血管周囲性細胞浸潤(図2a, b)が見られた。またHE所見で比較的形態を保つ神経細胞の細胞質にJEV抗原(図2c, d)を検出した。その他の臓器では組織所見は見られず、JEV抗原も検出されなかった。21日間、生存したマウスの諸臓器に病変はなく、JEV抗原も陰性であった。

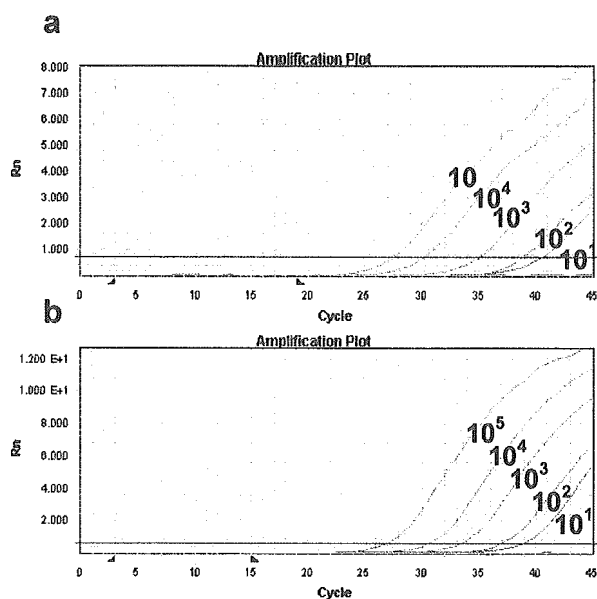


図1. WNV(a)およびJEV(b)のreal-time PCR

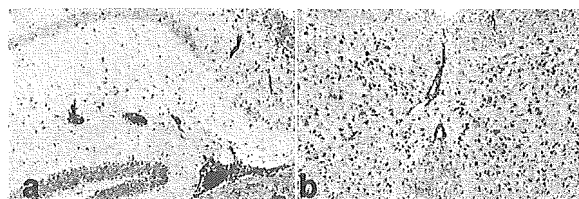


図2. JEV接種マウスの病変. a: 大脳HE染色、b: 脊髄HE染色、c: 大脳、抗JEV抗体免疫染色、d: 脊髄、抗JEV抗体免疫染色

D. 考察

WNV の病理学的診断法の一つとして免疫組織化学法の系を確立するため調べた WNV の抗体は全て JEV の症例とは交差性を示さず、これらを用いて JEV と鑑別診断ができることが分かった。WNV と JEV は血清学的にも遺伝子的にも近似であり鑑別が難しいため、免疫組織化学法で鑑別できることは非常に有用であると思われる。さらに症例数を増やし、検討が必要である。またもう一つの病理学的診断法的手段として、real-time PCR 法によるゲノム検出の系を確立した。プラスミドによる感度確認では、WNV および JEV とともに非常に感度の高いプライマーであることがわかった。今後、パラフィン切片から回収したゲノムでの検出を試みたい。

BALB/c マウスに3つの接種経路で JEV を接種したが全ての経路で発症した。発症したマウスには全て脳、脊髄に病変が見られ、ヒトの JEV 患者の脳病変と同じであった。また JEV 抗原は比較的形態の保たれた神経細胞の細胞質に局在しており、ヒトの JEV 症例と類似していた。この結果から、今回作製した JEV 接種マウスは JEV 動物モデルになると考えられ、次に作製する WNV 動物モデルとの病態比較に使用できる。

E. 結 論

JEV と WNV を鑑別するための病理学的診断法を開発したが、いまだ多くの例での検討が必要である。RT-PCR 法によるゲノム検出も試みる予定である。本年度は、マウスへの JEV 感染実験により JEV のレファレンス試料を得た。また JEV 動物モデルが作製でき、WNV の病態解析の上で非常に有用である。来年度は WNV のレファレンス材料の作製およびワクチン評価のための感染モデルの作製を行う予定である。

F. 健康危険情報

とくになし。

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
なし

分担研究報告書

ウエストナイルウイルス NS4B の核内移行に関する研究

分担研究者 倉根 一郎（国立感染症研究所ウイルス第一部・部長）
協力研究者 前田 秋彦（北海道大学大学院獣医学研究科・助教授）
前田 潤子（北海道大学大学院獣医学研究科・研究員）
高木 弘隆（国立感染症研究所・研究員）

研究要旨

ウエストナイルウイルス（WNV）NS4B 蛋白質は、他のウイルス蛋白質と共にインターフェロンのアンタゴニストになること、感染の後期に細胞の核に局在することが報告されているが、その生物学的意義は不明な点が多い。そこで、本研究では、NS4B 蛋白質の核内への局在について解析し、その生物学的意義について考察した。NS4B 蛋白質は、ウイルスの感染細胞のみでなく、赤色蛍光色素を付加した融合蛋白質として、非感染細胞でも核に局在することが観察された。NS4B 蛋白質の核移行には、本蛋白質の C 末端 50 アミノ酸が重要であることが、欠損変異体の解析から明らかとなった。また、多くの NS4B 蛋白質が分裂細胞核に局在していることから、細胞分裂の制御に関与していることが示唆された。

A. 研究目的

フラビウイルスの非構造（NS）蛋白質の一つである NS4B 蛋白質は、他の NS 蛋白質と共に抗インターフェロン（IFN）効果を有することが報告されているが、その他の役割については不明な点が多い。また、フラビウイルスに属するクンジンウイルス（KUNV）の NS4B 蛋白質は、感染細胞の核に移行することが報告されている。しかし、NS4B 蛋白質の核移行のメカニズムやその役割は不明である。そこで、本研究では、ウエストナイルウイルス（WNV）NS4B 蛋白質の細胞内局在と動態を観察し、NS4B 蛋白質の核内への移行のメカニズムとその役割を解明することを目的とした。

B. 研究方法

WNV 感染細胞における NS4B 蛋白質の細胞内局在を、その C 末端 20 アミノ酸を用いて作製したペプチド抗体により解

析した。次に、NS4B 蛋白質の N 末端に赤色蛍光色素（RFP）を結合した融合蛋白質（RFP-NS4B）を哺乳動物細胞に発現し、生細胞における細胞内局在を蛍光顕微鏡下で観察した。また、RFP-NS4B 蛋白質の発現細胞を固定後、細胞核を DAPI で、 β -チューブリンをその抗体を用いて多重染色することにより、NS4B 蛋白質の細胞内局在をより詳細に解析した。

C. 研究結果

1. WNV 感染細胞における NS4B 蛋白質の細胞内局在の解析

WNV を Vero E6 細胞に感染し48時間後に、細胞を固定した。NS4B 蛋白質に対するペプチド抗体を用いて、感染細胞の NS4B 蛋白質の局在を検討したところ、細胞の核に局在した（図1A, B）。興味深いことに、NS4B 蛋白質の一部は分裂細胞の核にも局在した（図1C, D）。

2. 赤色蛍光色素（RFP）を融合させた

NS4B 蛋白質 (RFP-NS4B) の細胞内局在の解析

次に、RFP-NS4B 発現ベクター (pDsRed2-WNV-NS4B) を構築し、RFP-NS4B 蛋白質を細胞に一過性に発現させ、その細胞内局在を観察した。pDsRed2-WNV-NS4B を Vero E6 細胞に導入後 48~72 時間に、RFP-NS4B 蛋白質の局在を蛍光顕微鏡下で観察した (図 2A)。感染細胞の場合と同様に、発現細胞においても NS4B 蛋白質は核に局在した (図 2A, d, e, f)。また、発現細胞を固定後、細胞核と β -チューブリンと共に多重染色した (図 2B, d)。更に、NS4B 蛋白質の細胞内動態を Time laps 解析したところ、細胞質で合成された NS4B 蛋白質の核内移行の過程が観察された (図 2C)。

3. WNV NS4B 蛋白質核内移行の機能部位のマッピング

NS4B 蛋白質の核内移行に関与するアミノ酸領域を同定するため、NS4B 蛋白質の欠損変異体を発現するベクターを構築した。発現ベクターを Vero E6 細胞に導入し、NS4B 蛋白質の欠損変異体の細胞内局在を観察した (図 3B, C)。その結果 NS4B 蛋白質の核内移行には、その C 末端 50 アミノ酸領域が関与していることが明らかとなった (図 3C)。

D. 考察

WNV 感染細胞の NS4B 蛋白質と、一過性に細胞に発現させた RFP-NS4B 蛋白質は、いずれも細胞核に局在することが明らかとなった。このことは、RFP を融合させた NS4B 蛋白質の細胞内局在が、WNV 感染細胞における NS4B 蛋白質の細胞内局在を良く反映しているもと考えられた。発現している NS4B 蛋白質が、分裂期にある細胞核に局在していたことから、NS4B 蛋白質は細胞の分裂を制御している可能性が示唆された (図4)。また、NS4B 蛋白質は、ウイルスの他の NS 蛋白質と

共に抗 IFN 効果を有することが報告されていることから、感染細胞の核において IFN の産生に関与する細胞因子を制御しているのかもしれない。本研究は WNV 感染に伴う宿主応答やウイルス増殖のメカニズムの解明に繋がるものと考えられる。

E. 結論

WNV の NS4B 蛋白質は、感染細胞の核に局在する。しかし、その生物学的意義は明らかでない。本研究により明らかとなった様に、NS4B 蛋白質は分裂細胞核に局在し、娘細胞に伝達される。本研究は、WNV NS4B 蛋白質のウイルス学および生物学的な解明に繋がるものと考えられる。また、WNV の基礎的な研究を通して、ウイルスの性状を明らかにし、新規の抗ウイルス薬やワクチンの開発に繋がることが期待される。

F. 健康危険情報 特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表
なし。
2. 学会発表
第 53 回 日本ウイルス学会(横浜)前田秋彦、前田潤子、高木弘隆、倉根一郎、堀内基広
「ウエストナイルウイルス
NS4B 蛋白質の核内移行の解析」

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

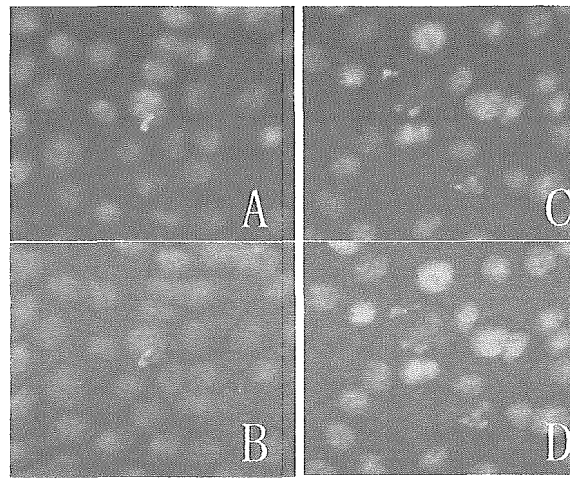


図1. WNV 感染細胞における NS4B 蛋白質の細胞内局在

WNV を Vero E6 細胞に感染し、48 時間後に細胞を固定した。NS4B 蛋白質の C 末端 20 アミノ酸のペプチドで免疫したウサギ血清を用いて、細胞内の NS4B 蛋白質を検出した (赤)。細胞の核は DAPI 染色した (青) (A, C)。また、A と C の位相差像を B と D に示した。

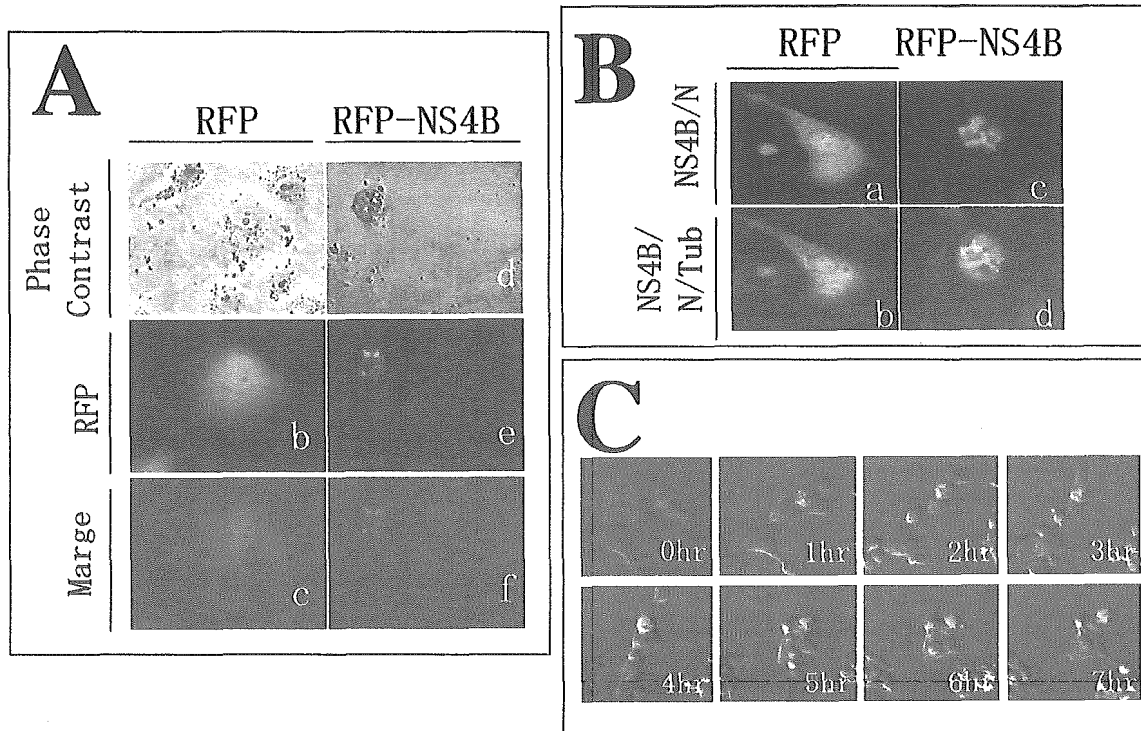


図. 2. 赤色蛍光色素 (RFP) で標識した WNV の NS4B (RFP-NS4B) 蛋白質の細胞内局在

A: RFP 発現ベクター、pDsRed2 (a, b, c) および RFP-NS4B 発現ベクター、pDsRed2-WNV-NS4B (d, e, f) を細胞に導入し、48 時間後の各蛋白質の生細胞内での局在を蛍光顕微鏡下で観察した。B: 各ベクターを導入後 72 時間に細胞を固定し、細胞核 (N) を DAPI (青) で、 β -チューブリン (Tub、緑) をその抗体を用いて多重染色した。a および c: それぞれ、pDsRed2 と pDsRed2-WNV-NS4B を導入した細胞の核と RFP (赤) あるいは RFP-NS4B (赤) との二重染色像。b および d: a および c の細胞を、更に抗 Tub 抗体を用いて染色した像。C: pDsRed2-WNV-NS4B を導入した Vero E6 細胞に発現する NS4B 蛋白質を、Time laps 解析した像を示す。図中の時間は、観察を始めた時点からの時間経過を示す。

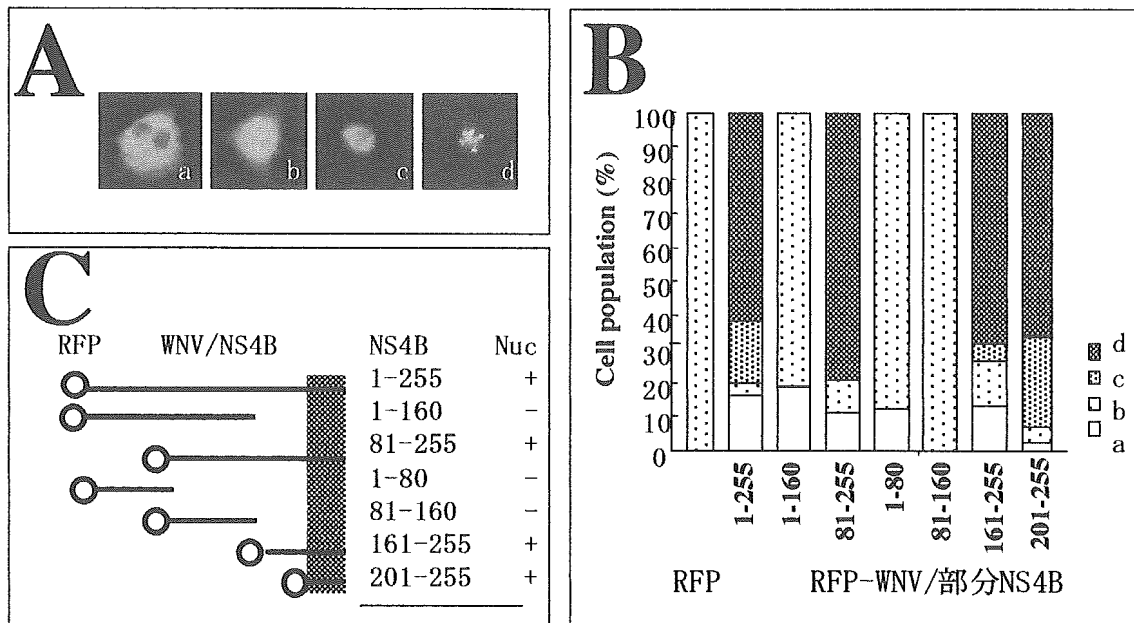


図. 3. WNV NS4B 蛋白質核内移行の機能部位のマッピング

A: WNV-NS4B 蛋白質の細胞質 (a)、細胞全体 (b)、核全体 (c) および核内 (d) への細胞内局在を示す。B: RFP と融合した NS4B 蛋白質とその欠損体 (表の下部に示すアミノ酸領域を有する) を Vero E6 細胞に導入し、72 時間後の発現蛋白質の細胞内局在 (A の a から d に対応する) を観察した全細胞数に対する割合として表示した。C: B の結果を核への局在の有無 (Nuc+ あるいは - として表示) として示した。図中、青帯は NS4B 蛋白質の C 末端 50 アミノ酸の、核内移行に関与すると考えられる領域を示す。