

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

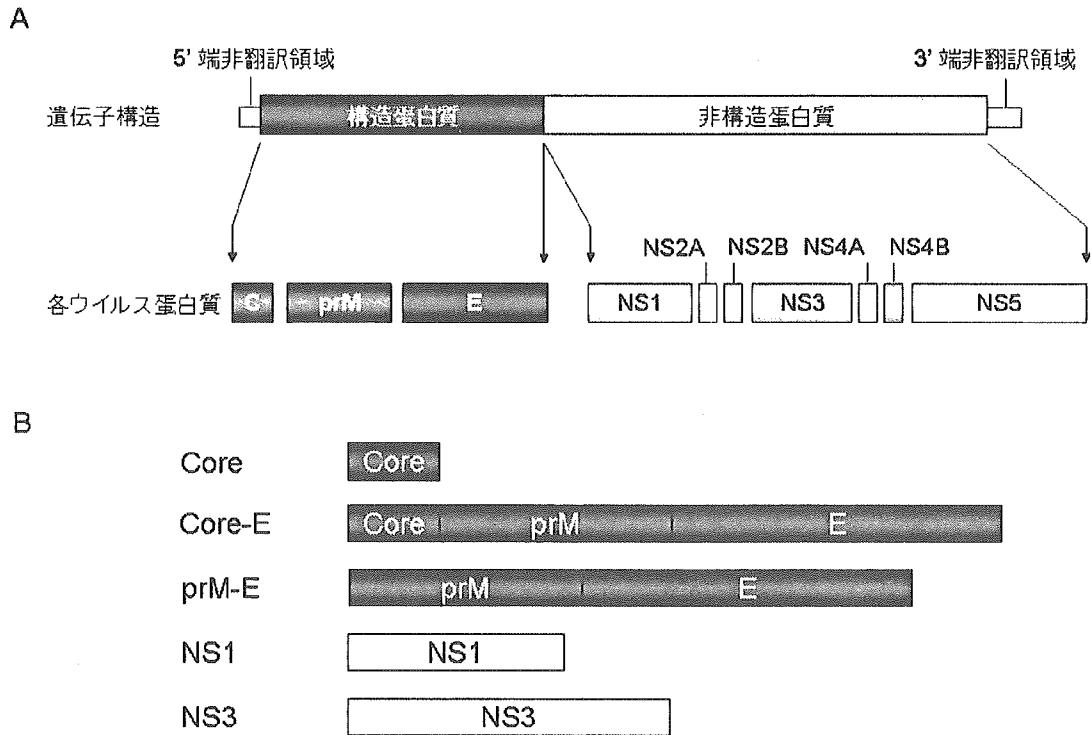


図 1 目的導入日本脳炎ウイルス遺伝子

A. 日本脳炎ウイルスのゲノムの構造. 日本脳炎ウイルスゲノムは約 11kb の一本鎖プラスの RNA で 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. B. 目的導入遺伝子は液性免疫, 細胞性免疫応答に関与している構造蛋白質 prM, E, 非構造蛋白質 NS1, NS3 を中心に構成した.

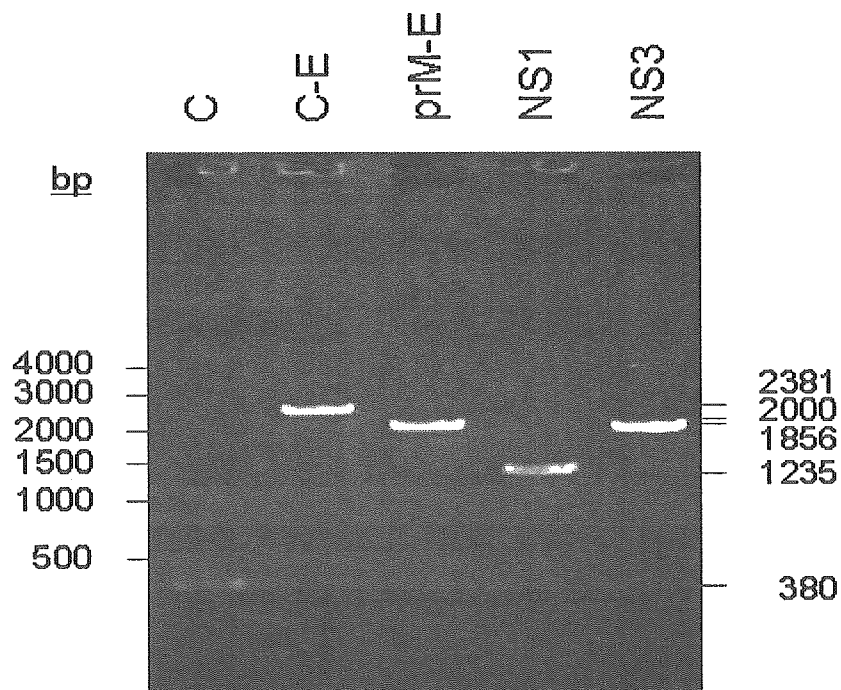


図 2. JE 組換えセンドライウイルス cDNA プラスミド構築の手順
 2.4×10^9 PFU の日本脳炎ウイルス培養上清から RNA を抽出し日本脳炎ウイルスの各抗原遺伝子を RT-PCR にて増幅した. その結果 C 蛋白質 (380bp), C 蛋白質から E 蛋白質 (2381bp), prM 蛋白質から E 蛋白質 (2000bp), NS1 蛋白質 (1235bp), NS3 蛋白質 (1856bp) の各抗原遺伝子を得た.

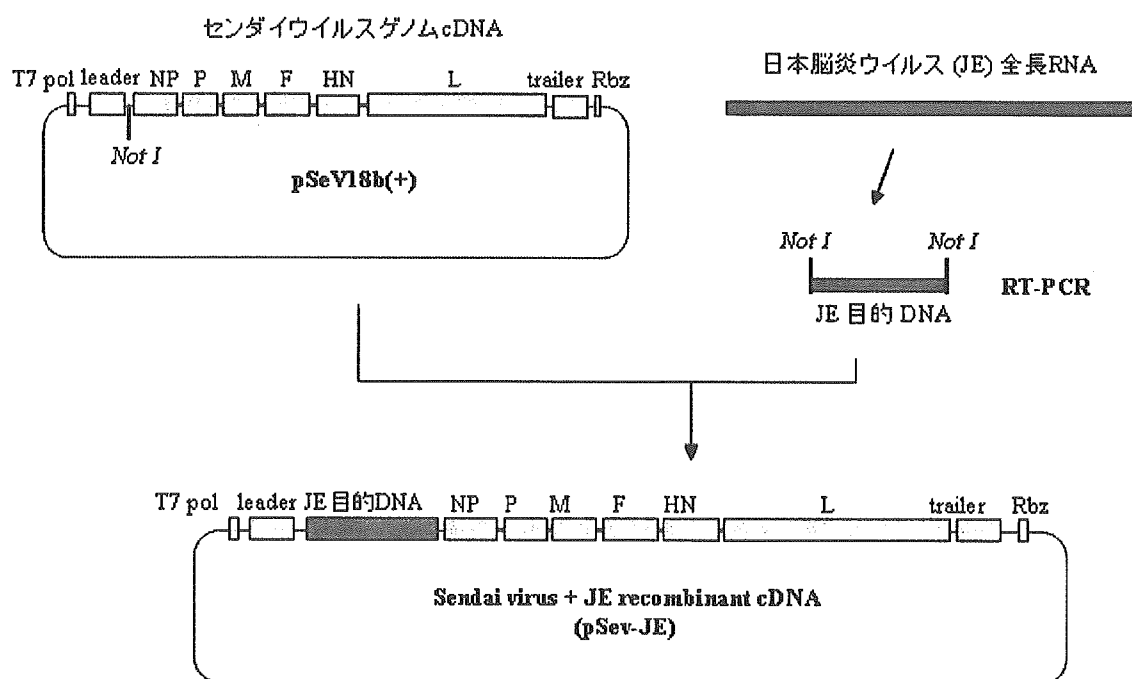


図3. JE組換えセンダイウイルス cDNA プラスミド構築の手順
 RT-PCRにて得られた各日本脳炎ウイルス抗原蛋白質の領域遺伝子をセンダイウイルス Z 株の cDNA プラスミド pSev18b(+)に導入した。

デングウイルスワクチン評価のための小動物感染モデルの構築

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 濱野正敬（国立感染症研究所ウイルス第一部）

倉根一郎（国立感染症研究所ウイルス第一部）

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のウイルスで、現在実用化に向けてワクチンが開発中である。デングウイルスには1型、2型、3型、4型が存在し、均等な免疫を誘導しない場合、ワクチン接種によりデング出血熱を来たす可能性が生じる。そのため、ワクチンの評価のための動物モデルの開発が必要である。デングウイルス感染によりウイルス血症を来たす動物としてサルが挙げられるが、取り扱える施設の制限およびコスト面でワクチン評価には適さない。我々は、マウスよりは大きい十分に扱いやすい小動物であり易感染性であるスナネズミに着目した。白色系・黒色系・褐色系の3系統のスナネズミを用いて検討し、白色系がデングウイルス感染により、ウイルス血症を来たすことを見出した。

A. 研究目的

デングウイルス研究において、マウスレベルの小動物を用いた感染実験は、飼育スペースや維持、経済的コスト、そして倫理的な問題を考慮する上で特に重要となる。1984年、Nawa M. によりスナネズミ腎臓由来(GK)細胞でデングウイルスが増殖することが報告されている(*Microbiol. Immunol.* 28:765-76.)。このことに着目し、GK細胞を用いてまず、*in vitro* 感染実験を行い、ウイルスの増殖を確認した後、デングウイルスおよびデングウイルス感染 GK細胞をスナネズミに腹腔内接種し、定期的に採血、観察を行った。本実験・研究は、現在実用化に向けて開発中であるワクチンの評価のための実験感染モデル動物開発の目的で、易感染性といわれるスナ

ネズミが利用可能であるか検証することを目的として行った。

B. 研究方法

白色系 (Mg-W)・黒色系 (Mg-B)・褐色系 (Mg-BW) の3系統のスナネズミに、デングウイルス1型 10^7 pfu/mL を腹腔接種した。経時的に眼窩静脈から採血し、ウイルス RNA を抽出し、ウイルス血症の有無をリアルタイム PCR (TaqMan RT-PCR 法) により検査した。また、IgG ELISA により抗体上昇を測定した。初回ウイルス接種後、長期間観察を続け、血中 IgG 抗体が低下したのを確認した後、デングウイルス2型を腹腔内接種した。再び経時的に採血し、TaqMan-PCR および IgG ELISA を実施した。

C. 研究結果

スナネズミを用いた *in vivo* 感染実験において、デングウイルスの初感染ではウイルス血症を起こすことは無かったが、異なる血清型のデングウイルスを 3-4 ヶ月後に接種することでウイルス血症を引き起こすことが確認された。TaqMan PCR 実験の結果から、血清中にウイルス RNA が検出されるが、いずれも検出サイクル(Ct)の後半(35-40)であり、またウイルス分離が容易に可能なほどのウイルス増殖はみられなかった。しかし、このウイルス血症のウイルス量は、カニクイザルにおけるものと同様である。また、IgG ELISA の結果、ウイルスの感染後に有意にデングウイルスに対する抗体価は上昇していた。白色系・黒色系・褐色系いずれの接種群も顕著な臨床症状はみられなかったが、体重の減少を指標にすると、Mg-W 系（白色系）スナネズミ群が他の系統群に比べ、有意に体重の減少を示していた (Mg-W)。スナネズミ (Mg-B) の剖検材料からは、腎臓、脾臓、肺においてウイルス RNA が検出されたが、肝臓からは検出されなかった。

D. 考 察

スナネズミを用いたデングウイルス感染実験において、異なる型のウイルスを再感染させた場合、ウイルス血症が確認された。また、出血熱症状は観察されなかったが、白色系 (Mg-W) では、体重減少が認められた。スナネズミはマウスよりはるかにデングウイルスに感受性が高く、サルに匹敵する動物モデルであり、デングウイルス感染症を研究する上で重要な小動物感染モデルになりうると考えられ、ワクチン

の評価にも使用できる可能性が高いと思われる。

E. 結 論

スナネズミ（特に白色系：Mg-W）が、デングウイルス感染小動物モデルになりうることが明らかとなった。今後感染ウイルス株、感染条件等を検討することが必要である。

F. 健康危険情報

なし

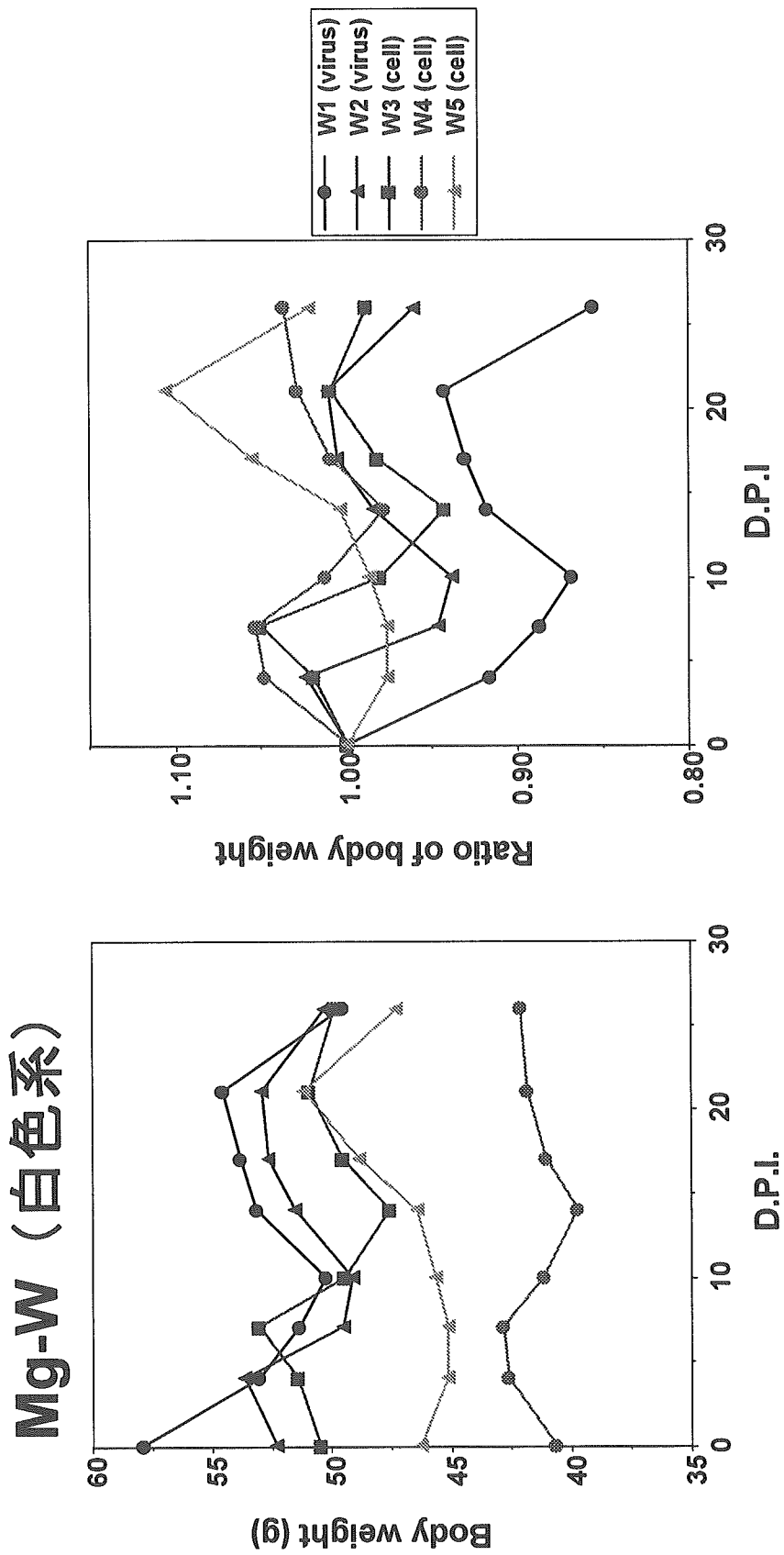
G. 研究発表

濱野正敬、田島茂、伊藤美佳子、小滝徹、高崎智彦、倉根一郎. 小動物を用いたデングウイルス実験感染モデルの構築. 第 53 回日本ウイルス学会（横浜）2005 年 11 月

H. 知的財産の出願・登録状況

なし

図1. デングウイルス2型接種後の体重の変化



Ratio of body weight は、ウイルス接種時の体重を1.0とした割合である。

サイトメガロウイルスワクチンの評価法の開発に関する研究

分担研究者：井上 直樹（国立感染症研究所ウイルス第一部）
協力研究者：野澤 直樹（国立感染症研究所ウイルス第一部）

研究要旨 サイトメガロウイルス（CMV）の先天性感染を防御するにはワクチンの開発が重要だと考えられる。特定のCMV抗原をウイルスベクターを用いて発現させ、その免疫応答及び防御効果を検討する動物モデルとして、小動物ではモルモットが唯一経胎盤感染が可能なことから、モルモットCMVを用いた評価系の基礎的研究を行った。まず、国内で入手可能な近交系株すべてについてモルモットCMVに対する感受性を比較したところ、マウスとは異なり近交系間で感受性に大きな差は見られなかった。リアルタイムPCRを用いて各臓器でのウイルス量を測定し感染動態を検討したところ、脾臓・肝臓・肺などを中心とした全身感染が感染1週目においては見られるのに対し、3週目では唾液線に大量のウイルス分布が見られ、他の臓器では若干感染が残っているパターンに移行していることを見出した。従って、モルモットでは唾液を介した感染経路が推定される。さらに、緑色蛍光蛋白を発現する組換え体モルモットCMVを作成し、培養細胞における増殖性について確認した。gBなどのCMV抗原を発現する狂犬病ベクターによる免疫効果をこれらの系を用いて今後検討する。

A. 研究目的

公衆衛生の観点からワクチンの開発が重要な疾病としては新生児ヘルペスと先天性CMV感染症がある。前者は、妊婦のHSV初感染ないしは再活性化に伴う産道感染による。抗ウイルス剤の発達により致死的ではなくなったものの依然として重篤な後遺症を残す。一方、先天性CMV感染症は、妊婦の初感染に伴う経胎盤感染により新生児に疾病が発生するものである。その頻度は、200-500人に1人と高く、

顕性感染による致命的障害から、進行性の精神発達障害や難聴などを含むと考えられている。我々は、家庭に保存される乾燥臍帯中のCMVを検出する手法を用いて、高度難聴児の15-20%が先天性CMV感染によることを明らかにしてきた（投稿中）。妊婦の初感染を防御する最も有効な手段はワクチンと考えられる。しかしながら、CMVは宿主特異性が高くヒトCMVは小動物に感染しないこと、胎盤の構造の違いからマウス・ラットでは先天性

CMV感染が起きないことなどから、ワクチンの先天性感染防御効果の評価を容易にできないのが現状である。モルモットCMV(GPCMV)はモルモット胎児に感染し、死産にはじまり聴覚障害をも生じさせることができる。しかしながら、GPCMVゲノムの全塩基配列が決定されていないことや感染初期に発現される前初期蛋白に対する抗体が存在しないなど、感染増殖とワクチンの阻害効果を解析するためには限界がある。そこで、ウイルスベクターワクチンの開発のための研究と併行して、モルモットCMV感染動物モデルを有効に利用できるための基礎的検討として、近交系間でのウイルス感受性の比較、感染後のウイルスの組織分布の解析、緑色蛍光蛋白を発現する組換え体モルモットCMVの作製を本年度は行った。

B. 研究方法

1. リアルタイムPCR

4-5週齢のモルモットの腹腔中に 1×10^6 PFUのGPCMVを接種し、各臓器におけるウイルス量をリアルタイムPCR法により測定した。各組織からのDNA抽出にはQIAGEN DNAMini kitを用いた。Schleissらのグループが報告したGP83遺伝子を標的とするリアルタイムPCRによりGPCMVのゲノムコピー数を得た。また、細胞数当りに標準化するために宿主の繰り返し配列SINE遺伝子のコピー数をリアルタイムPCRにて測定した。

2. GPCMVの増殖とゲノムDNAの精製

モルモット肺由来繊維芽細胞(GPL)は、10%仔牛血清を含むHam's F12培地にて培養した。GPCMVはGPL細胞を用いて増殖させた。ゲノムDNA調製のために大量の感染細胞を得る時には感染細胞を未感染細胞と1:5-1:10となるように培養し、3-4日後に50-70%程度の細胞で細胞変性効果(CPE)が見られる条件下で細胞を集め、Strausらの方法に従いゲノムDNAをnucleocapsid DNAとして精製した。

3. 組換えGPCMVの作製

SV40プロモーターによりGFP遺伝子が発現されるカセットを、EcoRI L断片中にコードされるGP35とGP37の間に挿入したトランスファーベクタープラスミドを構築した。このプラスミドDNAとゲノムDNAをGPL細胞にFugene6を用いて遺伝子導入し、細胞内で相同的組換えを起こさせた。約1週間後の感染細胞を培養液ごと凍結融解・超音波破碎処理し、組換えGPCMVと野生型GPCMVの混合液を得た。これを24穴プレートの多数のウェル中のGPL細胞に感染させ、アガーを重層後培養し、緑色蛍光蛋白の発現が認められるプラークを採取した。このプラーク精製過程を数回繰り返すことで、野生型ウイルスを含まない組換えウイルス標品を得た。

GPCMV感染細胞の同定は、パラフォルアミドにより固定後0.05% TritonX処理し、抗モルモットモノクローナルg-1(浜松医大筒井教

授より分与された) 及びパーオキシダーゼ標識抗マウス抗体と反応後 DAB にて免疫染色することで行った。

(倫理面の配慮)

組換え GPCMV の作成は遺伝子組換え生物等の第二種使用等拡散防止措置の大臣確認に対する承認を得て行われた。実験動物の使用は、実験動物委員会の承認のもと動物愛護の精神に基づき行われた。

C. 研究結果

1. 近交系間の GPCMV 感受性の比較

近交系として Hartley に加えて Strain2、Strain13、JY-2、Weiser-Maple を比較した。その結果、近交系間での GPCMV 感受性には差がないことが示された。(図1) 感染による影響は体重変化を含め表面的には観察されなかった。

2. 感染後のウイルスの臓器分布の解析

GPCMV を接種後、1 週および 3 週にてウイルスの臓器分布をリアルタイム PCR で測定した。その結果、1 週では各臓器で感染が認められるが、3 週ではコピー数が約 100 分の 1 程度にまで低下する一方、唾液腺に大量のウイルスが分布することが示された (図2)。肺、脾臓の病理標本では若干の炎症反応が検出されたが、ゲノムコピー数に比してモノクローナル抗体で染色陽性となる細胞数は少なかった。

3. 組換え体 GPCMV の作製と増殖性の検討

1) GFP を発現する組換え GPCMV の構築法のデザインを図3に示した。組換え体の構造確認は、GP35 及び GP37 内に設定したプライマーを用いて PCR を行い GFP 遺伝子カセットを含むことで PCR 産物が長くなることを利用した方法及び組換えウイルスゲノム DNA を精製し制限酵素切断により GFP カセットが挿入されていることを示すサザンブロッティング法の 2 通りでおこなった。

2) 得られた組換えウイルスと野生型ウイルスを GPL に感染後、その増殖の経時的変化を解析した。組換えウイルス量については、蛍光顕微鏡下で緑色蛍光を呈するプラーク数及びモノクローナル抗体を用いた免疫染色されたプラーク数を計数した。また、野生型ウイルスは免疫染色によった。これらの方法により得られた組換え及び野生型両ウイルス量の経時的変化はほぼ同一であり、組換え GPCMV の培養細胞内での増殖性は野生型ウイルスと変わらないと結論した。(図4) 組換え GPCMV のモルモット個体での増殖性について、親株との比較を含め現在検討を進めている。

D. 考察

組換え GPCMV による感染や唾液腺でのウイルス量のリアルタイム PCR による解析により、今後ウイルスベクターによりウイルス抗原を発現させて免疫した場合の防御効果を測

定することが可能となった。

ウイルスの個体での分布をみると唾液腺に大量のゲノム DNA が検出されることから、唾液を介した感染経路が推定される。ヒト CMV では尿にもウイルスが検出されることから、今後モルモットの尿を採取する工夫を試みたい。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Krug LT, Teo CG, Tanaka-Taya K, Inoue N. Newly identified human herpesviruses. *In*: (Eds) IW Fong, K Alibek Emerging Infectious Diseases of the 21st Century. Springer, NY. 印刷中
- (2) 井上直樹、野澤直樹 (2006) HCMV のゲノム構造と遺伝子機能 日本臨床 64 巻増刊号 3:377-385.
- (3) 野澤直樹、井上直樹 (2006) CMV の先天性感染機構 日本臨床 64 巻増刊号 3:446-450.
- (4) Wang G, Xu H, Wang Y, Gao X, Zhao Y, He C, Inoue N, Chen HD. (2005) Higher prevalence of human herpesvirus 8 DNA sequence and specific IgG antibodies in patients with pemphigus in China. *J. Am. Acad. Dermatol.* 52:46-467.

2. 学会発表

- (1) 野澤直樹、片野晴隆、中村幸之助、福井良子、山本由美子、小村仁美、筒井祥博、倉根一郎、井上直樹 「モルモットサイトメガロウイルス感染動物モデルを利用するための分子生物学的方法の構築」 第 20 回ヘルペスウイルス研究会 名古屋市、2005 年 6 月
- (2) 野澤直樹、古谷野伸、片野晴隆、福井良子、山本由美子、中村幸之助、小村広美、筒井祥博、倉根一郎、井上直樹 「先天性サイトメガロウイルス感染による感覚器障害の実態把握及びモルモット感染モデルを用いた障害発生機序解明のための緑色蛍光蛋白を発現する組換え体ウイルスの作製」 第 9 回日本神経ウイルス研究会 浜松市、2005 年 6 月
- (3) Y Fukui, Y Yamamoto, M Yanagi, N Nozawa, I Kurane, N Inoue. Establishment of a sensitive reporter cell line for human cytomegalovirus. 30th International Herpesvirus Workshop IHW2005, Finland, Jul 30-Aug 4, 2005.
- (4) N Nozawa, H Katano, K Nakamura, Y Fukui, Y Yamamoto, Y Tsutsui, I Kurane, N Inoue. Construction and application of a recombinant guinea pig cytomegalovirus expressing green fluorescent protein for analyses of the mechanisms of congenital cytomegalovirus infection. 30th International Herpesvirus Workshop IHW2005, Finland, Jul 30-Aug 4, 2005.
- (5) GQ Wang, Y Yamamoto, Y Fukui, N Nozawa, M Takayama, DS Schmid, I Kurane, N Inoue.

- Characterization of VZV promoters and development of reporter cell lines for VZV. 12th International Conference on Immunobiology and Prophylaxis of Human Herpesvirus Infections. Osaka, Oct. 6-8, 2005.
- (6) N Nozawa, T Suzutani, K Omori, S Koyano, Y Fukui, Y Baba, H Ogawa, Y Yamamoto, M Yanagi, H Komura, I Kurane, N Inoue. Development of novel diagnostic assays for human cytomegalovirus (HCMV) infection and their applications. 12th International Conference on Immunobiology and Prophylaxis of Human Herpesvirus Infections. Osaka, Oct. 6-8, 2005.
- (7) N Nozawa, H Katano, K Nakamura, Y Fukui, Y Yamamoto, Y Tsutsui, I Kurane, N Inoue. Molecular and pathological characterization of guinea pig cytomegalovirus infection. 12th International Conference on Immunobiology and Prophylaxis of Human Herpesvirus Infections. Osaka, Oct. 6-8, 2005.
- (8) 井上直樹、野澤直樹、倉根一郎 「ヒトサイトメガロウイルス (HCMV) 及び水痘帯状疱疹ウイルス (VZV) の力価の迅速測定用レポーター細胞の樹立」第 53 回日本ウイルス学会学術集会、横浜市、2005 年 11 月
- (9) 野澤直樹, 片野晴隆, 筒井祥博, 倉根一郎, 井上直樹 「モルモットサイトメガロウイルス感染動物モデルを利用するための分子生物学的方法の構築と緑色蛍光蛋白質を発現する組換えウイルスの作製」第 53 回日本ウイルス学会学術集会、横浜市、2005 年 11 月
- G. 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 近交系モルモットのCMV感受性の比較

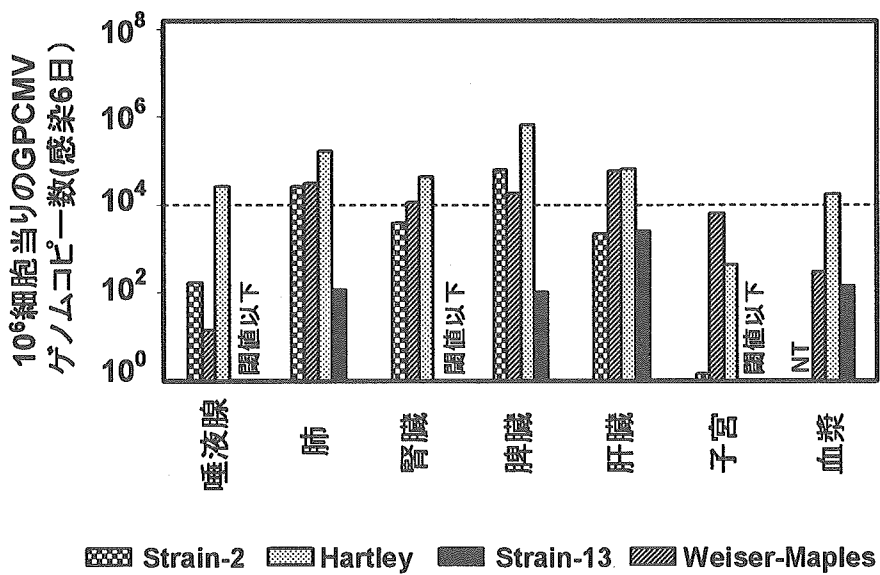


図2 感染後1ないし3週の各組織におけるウイルス量

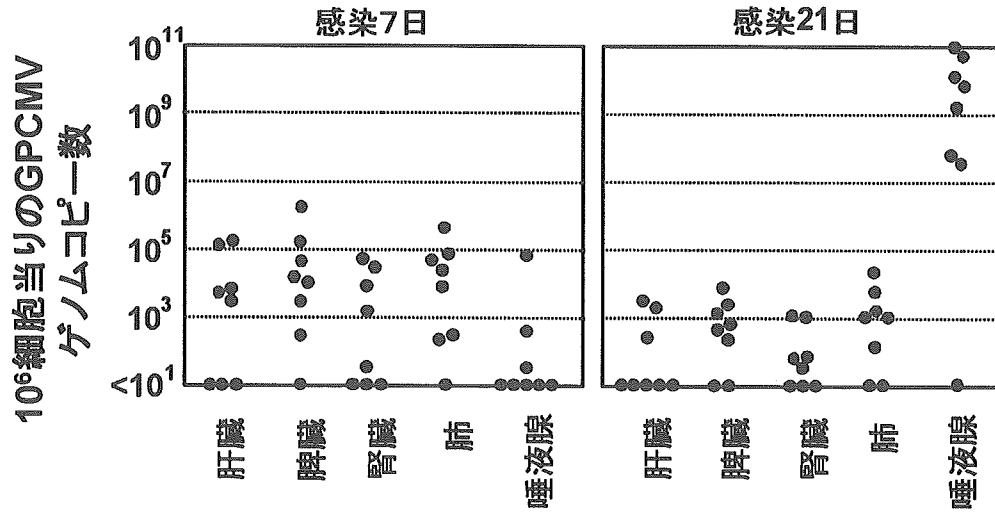


図3 GFP発現GPCMVの作製

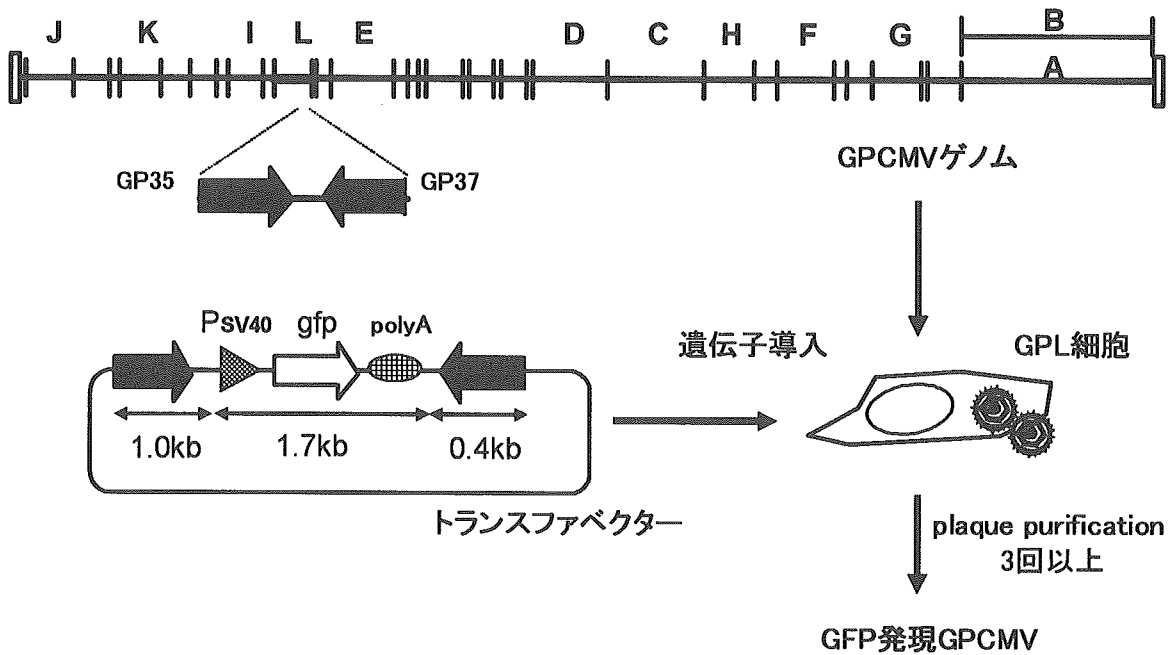
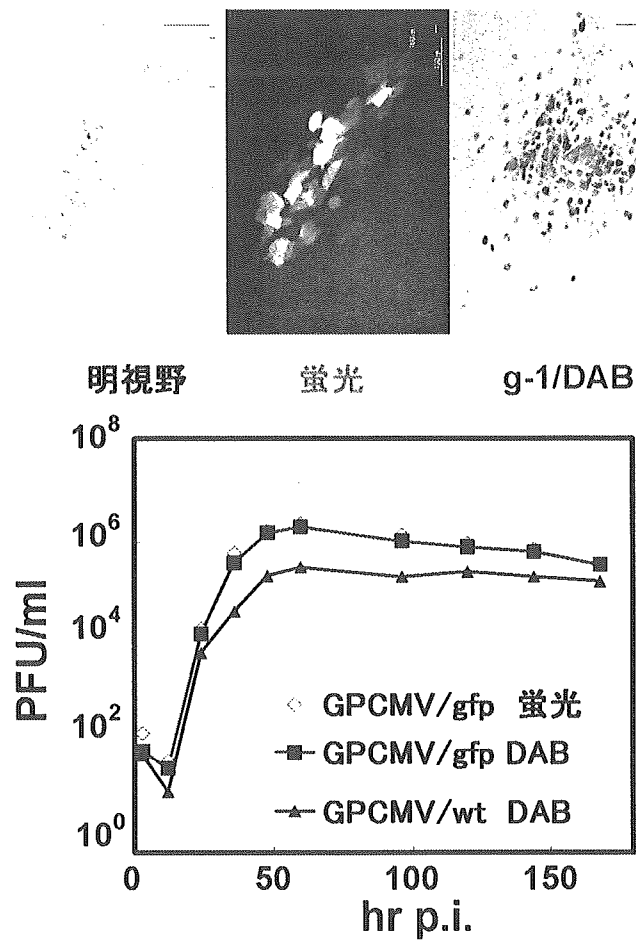


図4 培養細胞における増殖実験



天然痘ワクチン接種および非接種サルにおけるサル痘ウイルス
感染時の血中各種サイトカインレベルの Multiplex による解析
—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)

協力研究者: 網 康至 (国立感染症研究所動物管理室)

長谷川秀樹 (国立感染症研究所感染病理部)

永田典代 (国立感染症研究所感染病理部)

森川 茂 (国立感染症研究所ウイルス第1部)

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ている, そのため天然痘が根絶された今日においても, 天然痘ワクチンが再生産・備蓄され, その重要性が指摘されている. 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), 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. そこでカニクイザルにサル痘ウイルス Zr-599 株を感染させ, ワクチン効果を評価する系を開発した. Lister 株または LC16m8 株天然痘ワクチン接種群カニクイザルと非接種群カニクイザルに, 皮下接種法でサル痘ウイルスを感染させ, 臨床症状を観察し, さらに血中各種サイトカインレベルの推移を, Multiplex 法を用いて解析した. 非免疫サル群・免疫サル群でともに上昇する(非免疫サル群での上昇の程度はより高く, 免疫サル群では上昇の程度が低いものの反応の出現が早い)サイトカイン(IL-6, Eotaxin, IL-15, MCP-1, IL-5, TNF-alpha, IL-1R alpha, IL-7, MIG, IL-4, など), 非免疫サル群では上昇し, 免疫サル群では変化のないサイトカイン(IL-1 beta, IL-10, IFN-alpha, IL-12, IL-13, IL-17, MIP-1 alpha, GM-CSF, MIP-1 beta, IL-2, IL-2R など), 非免疫サル群で低下し, 免疫サル群で変化のないサイトカイン(RANTES), 非免疫サル群では変化がなく, 免疫サル群で高くなるサイトカイン(IFN-gamma, IL-8, など)が確認された. これらの推移は, 新規ワクチンの評価に有用な指標となると考えられる.

A. 研究目的

天然痘が根絶された今日においても, 痘そうウイルスがバイオテロリズムの兵器として用いられる危険性が指摘され, また, ヒトサル痘(ヒトにおけるサル痘ウイルス感染症)が

アフリカや米国で流行している現実から, 天然痘ワクチンの重要性はいまだに低下していない.

そのバイオテロリズム対策の一環として, 我が国では高度弱毒化天然痘ワクチン

LC16m8 株が再生産され、天然痘の出現に備えている。我が国で備蓄されている LC16m8 株は致死副作用の少ない安全な天然痘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。しかし、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、自然界からは根絶されているため、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用いたサルにおける感染実験モデルを開発し、ワクチン接種サル群と非ワクチン接種サル群における血中各種サイトカインレベルの推移を解析した。本研究では、multiplex 法を用いてサル痘ウイルス感染サルから経時的に得られた血漿中のサイトカインレベルを測定した。この成績は、新規開発ワクチンの評価を行う上で有用な指標となると考えられる。

B. 研究方法

- 1) カニクイザル。計 7 頭のカニクイザル (*Macaca fascicularis*) を使用した。
 - 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 Zr-599 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: 7 頭のカニクイザルのうち、2 頭には、ワクチン接種することなく 10^6 plaque forming unit (pfu) の Zr-599 株を皮下接種し(非免疫サル群)、残りの 5 頭(免疫サル群)には Lister 株または LC16m8 株ワクチニアワクチンを二股針を用いて右上腕に接種し、その 5 週間後に 10^6 pfu の Zr-599 株を皮下接種した。
 - 4) 血中サイトカイン: 血中サイトカインの濃度の測定は、蛍光マイクロビーズアレイシステム Luminex™ (HitachiSoft) を用いて、25 種類のサイトカイン(IL-1 beta, IL-1R alpha, IL-2, IL-2R, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12 p40/p70, IL-13, IL-15, IL-17, TNF-alpha, IFN-alpha, IFN-gamma, GM-CSF, MIP-1 alpha, MIP-1 beta, IP-10, MIG, Eotaxin, RANTES, MCP-1) を同時に測定するための Human Twenty-Five-Antibody Bead Kit (BioSource 社) による免疫アッセイで測定した。
- 5) 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: 非免疫サル群においては、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、徐々に潰瘍化しその病変は拡大した。全身皮膚には、300 から 1000 個にのぼる水疱性病変が出現し、全身状態が悪化し、ほぼ致死的な状態となったために(チャレンジウイルス感染後第 18 日)安楽殺を施行した。一方、免疫サル群では、サル痘ウイルスを皮下接種した部位の軽度の潰瘍の出現以外には、サル痘ウイルス感染に伴う症状は全く出現しなかった。
- 2) サイトカイン血症: IL-6, eotaxin, IL-15, MCP-1, IL-5, TNF-alpha, IL-1R alpha, IL-7, MIG, IL-4 は、非免疫サル群と免疫サル群でともに上昇した。非免疫サル群での上昇の程度は免疫サル群のそれより高い。しかし、興味深いことに、免疫サル群での上昇の程度は軽微なもので

あっても、感染 4 日後には上昇が認められ、サル痘の発症に一致してサイトカイン反応が認められる非免疫サル群とは異なる反応を示した(図 1A). IL-1 beta, IL-10, IFN-alpha, IL-12, IL-13, IL-17, MIP-1 alpha, GM-CSF, MIP-1 beta, IL-2, IL-2R は、非免疫サル群では上昇し、免疫サル群では変化が認められなかった(図 1B). RANTES は、非免疫サル群において病状の進行とともに低下し、免疫サル群では変化がほとんど認められなかった(図 1C). IFN-gamma, IL-8 は、非免疫サル群では変化がなく、免疫サル群で上昇していた(図 1D).

D. 考察

本研究においては、天然痘ワクチン接種サル群と非接種サル群における血中サイトカインレベルを、蛍光マイクロビーズアレイシステム Luminex™(HitachiSoft)を用いて、25 種類のサイトカインを同時に測定するための Human Twenty-Five-Antibody Bead Kit (BioSource 社)による免疫アッセイで測定し、ワクチン接種群と非接種群における免疫反応の違いを解析した。非接種群では、サル痘ウイルス接種部位の軽度の潰瘍形成以外の症状は呈せず、一方、非接種群では、致死性サル痘ウイルス感染症を発症した。臨床症状と血中サイトカインレベルの推移を解析すると、病状の進行に一致して上昇するサイトカイン(IL-1 beta, IL-6, IL-15, MIP-1 alpha, MIP-1 beta, MCP-1, TNF-alpha, IL-1R alpha, IL-2, MIG など)が認められた。検討された非免疫サル群は、2 頭のみで病状の程度とサイトカインレベルの関連については解析できない。更なる検討が必要である。非免疫サル群においては、発症と同時に感染後 7 日以降に上昇するサイトカインの中で、免疫サル群では感染 3 日目から上昇がみられるサイトカイン(IL-6, IL-15 など)が認められた。感染初期に免疫サル群におい

て防御機構の発現に一致して上昇するサイトカインと考えられ、ワクチンによる防御反応の程度を解析する上で重要な指標となると考えられる。

データには表示していないが、血中サイトカインを(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 法についても測定した。ELISA 法では、IL-6 と IFN-gamma のみに、感染後の血中レベルの上昇が確認された。このことは、蛍光マイクロビーズアレイシステム Luminex™の測定範囲および感度が、ELISA 法に比較して格段に高いことが示唆される。また、蛍光マイクロビーズアレイシステム Luminex™による測定では、少量のサンプルで、多くの種類のサイトカインを測定できるという利点があった。

新規に開発されるワクチンを霊長類を用いて評価する場合の指標として、蛍光マイクロビーズアレイシステム Luminex™を用いた各種サイトカインレベルの評価は、有用と考えられる。

E. 結語

霊長類感染モデルを用いて、新規に開発される痘そうワクチンの評価する上での評価の指標となる血中各種サイトカインの推移を解析した。サル痘ウイルス感染により、各種血中サイトカインレベルの変動するパターンを解析し、ワクチン評価の指標を明らかにした。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Saijo M, Morikawa S, Fukushi S, Mizutani T, Hasegawa H, Nagata N, Iwata N, Kurane I. Inhibitory effect of mizoribine and ribavirin on the replication of severe acute respiratory syndrome (SARS)-associated coronavirus.

- Antiviral Research 66:159-63, 2005
- 2) Saijo M, Niikura M, Maeda A, Sata T, Kurane I, Morikawa S. Characterization of monoclonal antibodies to Marburg virus nucleoprotein (NP) that can be used for NP-capture enzyme-linked immunosorbent assay. *Journal of Medical Virology* 76:111-118, 2005
 - 3) Saijo M, Ogino T, Taguchi F, Fukushi S, Mizutani T, Notomi T, Kanda H, Minekawa H, Matsuyama S, Long HT, Hanh NTH, Kurane I, Tashiro M, Morikawa S. Recombinant nucleocapsid protein-based IgG enzyme-linked immunosorbent assay for the serological diagnosis of SARS. *Journal of Virological Methods* 125:181-186, 2005
 - 4) Hatakeyama S, Moriya K, Saijo M, Morisawa Y, Kurane I, Koike K, Kimura S, Morikawa S. Persisting humoral anti-smallpox immunity among the current Japanese population after the discontinuation in 1976 of routine smallpox vaccinations. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 12:520-524, 2005
 - 5) Fukushi S, Mizutani T, Saijo M, Matsuyama S, Miyajima N, Taguchi F, Itamura S, Kurane I, Morikawa S. Vesicular stomatitis virus pseudotyped with severe acute respiratory syndrome coronavirus spike protein. *Journal of General Virology* 86:2269-2274, 2005
 - 6) Mizutani T, Fukushi S, Saijo M, Kurane I, Morikawa S. JNK and PI3K/Akt signaling pathways are required for establishing persistent SARS-CoV-infection in Vero E6 cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease* 1741:4-10, 2005
 - 7) Saijo M, Tang Q, Shimayi B, Han L, Zhang Y, Asiguma M, Tianshu D, Maeda A, Kurane I, Morikawa S. Antigen-capture enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of Crimean-Congo hemorrhagic fever using a novel monoclonal antibody. *Journal of Medical Virology* 77:83-88, 2005
 - 8) Morikawa S, Sakiyama T, Hasegawa H, Saijo M, Maeda A, Kurane I, Maeno G, Kimura C, Yoshida T, Asahi-Ozaki Y, Sata T, Kurata T, Kojima A. An attenuated LC16m8 smallpox vaccine: analysis of full-genome sequence and induction of immune protection. *Journal of Virology* 79:11873-11891, 2005
2. 知的財産権の出願・登録(予定を含む)
特許取得:該当なし
 3. 学会発表
 - 1) Mizutani T, Fukushi S, Saijo M, Kurane I, Morikawa S. Importance of JNK and PI3K/Akt signaling pathways for establishing persistent SARS-CoV infection in Vero E6 cells. Xth International Nidovirus Symposium. 2005年6月, Colorado Springs, CO, USA
 - 2) Nagata N, Iwata N, Hasegawa H, Asahi-Ozaki Y, Sato Y, Harashima A, Morikawa S, Saijo M, Itamura S, Saito T, Odagiri T, Tashiro M, Ami Y, Sata T. Pathological and virological analyses of SARS-CoV infections in experimental animals. Xth International Nidovirus Symposium. 2005年6月, Colorado Springs, CO, USA
 - 3) Fukushi S, Mizutani T, Saijo M, Matsuyama S, Taguchi F, Kurane I, Morikawa S. Pseudotyped vesicular stomatitis virus for functional analysis of SARS-CoV spike protein. Xth International Nidovirus Symposium. 2005年6月, Colorado Springs, CO, USA
 - 4) Saijo M, Ami Y, Nagata N, Hasegawa H, Fukushi S, Mizutani T, Iwata N, Suzaki Y, Sata T, Kurane I, Morikawa S. Highly attenuated vaccinia vaccine, LC16m8, protects monkeys from monkeypox. XIIIth International Congress of Virology. 2005年7月, San Francisco, CA, USA

- 5) Saijo M, Ami Y, Nagata N, Hasegawa H, Fukushi S, Mizutani T, Iwata N, Suzuki Y, Sata T, Kurane I, Morikawa S. Protection of non-human primates from monkeypox by highly attenuated vaccinia vaccine, LC16m8, that lacks expression of B5R membrane protein. US-Japan Cooperative Medical Science Program 39th Virology Panel Meeting. 2005年7月, San Francisco, CA, USA
- 6) 西條政幸, 網康至, 永田典代, 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(続報). 第53回日本ウイルス学会学術集会. 2005年11月, 横浜
- 7) 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コロナウイルス感染細胞におけるAktリン酸化の重要性. 第53回日本ウイルス学会学術集会. 2005年11月, 横浜
- 8) 福士秀悦, 水谷哲也, 西條政幸, 緒方もも子, 倉根一郎, 森川茂. VSVシュードタイプを用いたSARS-CoV感染の解析. 第53回日本ウイルス学会学術集会. 2005年11月, 横浜
- 9) 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, ラットを用いた経代によるSARS-CoVの病原性の変化. 第53回日本ウイルス学会学術集会. 2005年11月, 横浜
- 10) 福士秀悦, 水谷哲也, 西條政幸, 倉根一郎, 森川茂. SARS-CoVスパイクタンパク質とACE2の相互作用のVSVシュードタイプを用いた解析. 第28回日本分子生物学会年会. 2005年12月, 博多