

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）

分担研究総合報告書

- 1) 東北地方における疾病媒介蚊の分布域拡大に関する調査研究
- 2) ヤブカに寄生する原虫 *Ascogregarina* spp. に関する基礎的研究

分担研究者	小林 陸生	国立感染症研究所昆虫医科学部
研究協力者	二瓶 直子	国立感染症研究所昆虫医科学部
	Roychoudhury, S.	国立感染症研究所昆虫医科学部
	斉藤 一三	国立感染症研究所昆虫医科学部
	伊澤 晴彦	国立感染症研究所昆虫医科学部
	佐々木 年則	国立感染症研究所昆虫医科学部
	澤邊 京子	国立感染症研究所昆虫医科学部
	津田良夫	国立感染症研究所昆虫医科学部

研究要旨

1) ヒトスジシマカに関する調査: 東北地方におけるヒトスジシマカの分布域調査に関して、2003年に盛岡で2コロニーからヒトスジシマカ幼虫が初めて確認されたが、2004年、2005年の調査で同蚊は確認できなかった。2004年の調査では太平洋岸の釜石で初めて確認され、2005年の調査では、能代の北約20kmの八森町で初めてヒトスジシマカが確認されたが、青森県の日本海側では見つかっていない。一方、3年前に同蚊が確認された気仙沼では市内広域に分布が広がっていた。しかし、大船渡で初めてヒトスジシマカが確認された。陸中海岸の諸都市において近い将来ヒトスジシマカが定着する可能性が高いと考えられた。

2) コガタアカイエカに関する調査: 分布周縁部にあたる東北地方での個体群密度に関して調査がなされていない。2005年8月上旬、秋田県大仙市（大曲市）と秋田市内の牛舎でライトトラップによる蚊の捕集を試み、トラップ・一晚当たりの捕集数は富山県の約1/100、埼玉県の約1/10程度と少なく、この事が秋田県におけるHI抗体陽性率の低さに関係している可能性が示唆された。

3) デング熱媒介蚊（ネッタイシマカとヒトスジシマカ）の寄生原虫である *Ascogregarina* spp. に関して生活環、生物学的特徴、オーシストの耐乾燥性等を詳細に調べ、種々の遺伝子解析に利用可能なゲノムDNAを高純度で得る方法を確立し、4種類の原虫の分子分類が可能となった。オオクロヤブカ原虫による生物的防除の可能性を検討する必要性が示唆された。

A: 研究目的

1) 我が国、特に東北地方におけるデング熱媒介蚊であるヒトスジシマカの分布域は、1950年代から比較すると相当北へ拡大しており、特に1990年代における分布域拡大

が顕著である。現在の分布状況に関する詳細なデータが存在しない。同蚊はデング熱のみならず、ウエストナイルウイルスに対しても高い感受性を示すことから、現在の分布域を正確に把握することが、感染症の

予防対策に重要である。また、疾病媒介蚊の分布域拡大がどのような要因に関係するか、気象データ、人口密度、温暖化を予想するメッシュ気候図を用いて検討する必要がある。

2) コガタアカイエカの分布調査は 1950 年代および一部 1960 年代に行われたが、その後の分布域および密度に関してほとんどデータがない。地球規模での温暖化傾向が日本脳炎媒介蚊の発生、分布にどのような影響を与えているか調査する必要がある。

3) ネットアイシマカおよびヒトスジシマカの寄生原虫である *Ascogregarina* spp. は宿主特異性が高く、最終的に多数のオーシストが水系に排泄される。このような生活環を利用し、この原虫に外来遺伝子を導入してヤブカ幼虫に感染させ、生理機能を攪乱させることによる蚊を防除を最終目的に基礎的研究を進めている。

B : 研究方法

1) 東北地方でのヤブカの分布調査においては、各都市の神社、寺院、公園、古タイヤ集積場等の墓石、手水鉢、花立て、プラスチック容器等の人工容器から幼虫を採取し、飼育後種の同定を行った。また、分布規定要因の解析としてメッシュ気候図、人口密度等の情報を GIS の手法で解析する。

2) コガタアカイエカの調査

大仙市（大曲市）の秋田県畜産試験場の牛舎、豚舎および秋田市内の牛舎でライトトラップを用いて捕集を行った。形態分類後ウイルス分離を行った（別事業）。

3) ヒトスジシマカ、オオクロヤブカ、ヤマトヤブカの原虫寄生状況を調査し、一部の種類に関してオーシストを大量に得る方法を検討した。また、オーシストの耐乾燥

性、スポロゾイトの vitro における生存時間、分子分類法の確立等を行った。

C : 研究結果

1) ヒトスジシマカに関する調査：東北地方におけるヒトスジシマカの分布域調査に関して、2003 年に盛岡では、2 コロニー(2 / 51)からヒトスジシマカ幼虫が初めて確認されたが、2004 年および 2005 年の調査で同蚊は確認できなかった。これは、2003 年に一時的に盛岡に侵入したヒトスジシマカが定着できなかったと判断された。能代から北へ約 20km の八森では、2005 年に初めて確認されたが、八森以北の日本海岸に存在する集落ではヒトスジシマカは確認されなかった。一方、2004 年に太平洋岸の釜石(1 / 19)で初めて確認されが、その後定着は確認されていない。一方、3 年前に同蚊が確認された気仙沼では市内広域に分布が広がっていた。2005 年には、大船渡(1 / 20)の港湾地域および 2 カ所の寺院での捕虫網による採集で初めてヒトスジシマカが確認された(図 1)。釜石、大船渡などの陸中海岸の都市では、近い将来ヒトスジシマカが侵入、定着する可能性が高いと考えられる。

2) コガタアカイエカに関する調査：コガタアカイエカの分布は琉球から北海道まで、日本脳炎ウイルス(JEV)に対する豚の抗体陽性率から、分布周縁部にあたる東北地方での個体群密度は相当低いことが想像される。2005 年 8 月の月上旬、秋田県大仙市（大曲市）と秋田市内の牛舎でライトトラップによる蚊の捕集を試み、富山県および埼玉県との同時期の捕集成績と比較した。その結果、トラップ・一晩当たりの捕集数は富山県の約 1/100、埼玉県の約 1/10 程度と

少なく、この事が秋田県の豚における HI 抗体陽性率の低さに関係している可能性がある。今後、宮城県、福島県等で調査する必要がある。

3) デング熱媒介蚊（ネッタイシマカとヒトスジシマカ）の寄生原虫である *Ascogregarina* spp. に関して生活環、生物学的特徴、オーシストの耐乾燥性等を詳細に調べ、種々の遺伝子解析に利用可能なゲノム DNA を高純度で得る方法を確立した。その結果、少なくとも 4 種の原虫を分子分類することが可能となった。また、系統樹解析を行ったところ、ヤマトヤブカおよびオオクロヤブカの原虫の塩基配列は上記の 2 種とは若干離れることが明らかとなった。特に、オオクロヤブカの原虫である *Ascogregarina armigerei* は分子的にも形態的にも相当異なることが明らかとなった。この原虫は栄養体が中腸上皮細胞に侵入してから中腸内を動き回る性質があり、最終的に栄養体同士が 10-20 匹集まっている像が観察されている。この行動は蚊の幼虫の中腸の上皮細胞に相当ダメージを与えることが想像され、他種の蚊幼虫の生物的防除に利用する可能性が示唆された。

D: 考察

1) 東北地方におけるヒトスジシマカの分布域拡大に関しては、年平均気温が分布域拡大と関係している可能性がメッシュ気候図で明らかとなった。しかし、例外的な地域が存在することから、人口密度、物流の量、道路網の発達など社会経済学的要因も含めて解析する必要がある。また、新天地へ侵入したヒトスジシマカが短時間で市内全体へ分布域を広げた都

市と、分布が一部に限局している都市とが存在する。これら分布周辺部における安定した定着が確保される個体群密度解析が必要である。

盛岡では、1998 年以前から数回にわたって、複数回ヒトスジシマカの調査が行われたが全く分布が確認されていなかった。しかし、2003 年 9 月に、盛岡で初めてヒトスジシマカの分布が市内の 1 寺院で確認された。しかし、2004 年、2005 年の調査で多数のコロニーを採集したにもかかわらずヒトスジシマカは確認できなかった。盛岡の気候が同蚊の定着に適していない可能性があり、今後の温暖化および都市部のヒートアイランド現象等の推移を見守る必要がある。また、釜石でも同じ現象が確認された。相当頻繁にヒトスジシマカの移入が起きているが、越冬卵が翌年まで生存し、定着することができない例が多数あることが示唆された。我々の年平均気温による分布要因解析では分布が可能な地域となっているにもかかわらず、未だに定着が認められない地域として、秋田県の湯沢、宮城県の花巻、北上、釜石、青森県の岩崎、深浦、鯉ヶ沢が知られている。年平均気温のデータ等から判断して、今後近い将来に同蚊の侵入・定着が起こる可能性があるが、移入自体が起こりづらい可能性が考えられ、理由の一つにヒトスジシマカの分布する関東、南東北地域からの物流の量があると想像される。また、東北地方全域に既に分布しているヤマトヤブカがどのようにヒトスジシマカの侵入に係わっているか不明である。この問題は、亜熱帯・熱帯地域におけるネッタイシマカとヒトスジシマカとの棲み分けに共通する現象で、今後より詳細な解析

が必要と思われる。

2) コガタアカイエカの東北地方における分布および個体群密度に関しての最近の調査は行われておらず、最近の温暖化傾向を考えた場合、どの程度コガタアカイエカの個体密度が高まったかを把握する必要がある。日本脳炎ウイルス(JEV)に対する豚の抗体陽性率から、東北地方の分布周縁部での個体群密度は相当低いことが想像され、秋田県大仙市(大曲市)と秋田市内の牛舎でライトトラップに捕集数は、富山県の約1/100, 埼玉県の約1/10程度と少なく、この事が秋田県の豚におけるHI抗体陽性率の低さに関係している可能性がある。

3) デング熱媒介蚊(ネッタイシマカとヒトスジシマカ)の寄生原虫である*Ascogregarina* spp.は宿主特異性が高く、ヤブカ幼虫に大量に感染させることによって、容易に多数のオーシストを回収することが出来る。この生物学的特徴を利用して、外来遺伝子の運びや(vector)として利用し、新しい防除法の確立を最終目標として基礎的研究を行った。原虫の生活環、生物学的特徴、オーシストの耐乾燥性等を詳細に調べ、種々の遺伝子解析に利用可能なゲノムDNAを高純度で得る方法を確立した。その結果、4種の原虫を分子分類することが可能となった。これら原虫の性質を利用して、他種の蚊幼虫の生物的防除に利用する可能性が示唆された。

E:結論

1)ヒトスジシマカに関する調査:東北地方におけるヒトスジシマカの分布域調査に関して、年平均気温、物流、人口密度などの要因が関係していることが示唆された。デング熱、ウエストナイル熱等の媒介能力か

ら同蚊の分布域を把握する必要性は高いと考えられる。

2) コガタアカイエカに関する調査:分布周縁部にあたる東北地方での個体群密度は相当低いことがしめされたが、今後の温暖化の推移等を注視して媒介生態を解析する必要性が示唆された。

3) デング熱媒介蚊(ネッタイシマカとヒトスジシマカ)の寄生原虫である*Ascogregarina* spp.に関して生活環、生物学的特徴、オーシストの耐乾燥性等を詳細に調べ、種々の遺伝子解析に利用可能なゲノムDNAを高純度で得る方法を確立し、分子分類が可能となった。また、トウゴウヤブカ、ヤマトヤブカ、オオクロヤブカから上記2種とは異なる原虫を分離することに成功し、これらの原虫を生物的防除に利用する可能性が示唆された。

F:健康危機管理情報

特筆なし。

G: 研究発表

1. 発表論文

1)Roychoudhury, S. and Kobayashi, M.: New finding on the developmental process of *Ascogregarina taiwanensis* and *Ascogregarina chulicis* in *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti*. J. Am. Mosq. Control Assoc. (in press).

5)Kobayashi, M., Nihei, N. & Kurihara, T. Analysis of northern distribution of *Aedes albopictus* (Diptera:Culicidae) in Japan by geographical information system. Journal of Medical Entomology, 39(1): 4-11, 2002. (参考論文)

日本脳炎の疫学及びデングDNAワクチンの開発に関する研究

分担研究者 小西英二（神戸大学医学部医療基礎学講座）

研究要旨 (1)日本の住民における近年の日本脳炎ウイルス（JEV）自然感染の疫学調査、(2)デング4価DNAワクチンの作製及び評価、そして効果を高める投与法の工夫、を行った。その結果、(1)JEVの年間自然感染率は0.2%-3.4%であり、日本の住民は近年でも比較的高い率で自然感染を受けていること、(2)試作したデング4価DNAワクチンはマウスにデングの全ての型に対する中和抗体を誘導すること、そしてタンパクワクチン混合投与により中和抗体誘導能が相乗的に上昇すること、を示した。

A. 研究目的

日本においては近年日本脳炎患者数の減少と共にワクチン接種者の減少がみられ、ワクチン接種の意義が大きな問題となっている。住民における自然感染率は、勧奨接種再開に関わる大きな因子である。一方、デング熱及びデング出血熱は地球規模の疾患であるが認可ワクチンはない。流行地への導入に適するワクチンの1つとしてDNAワクチンが有力である。しかし、DNAワクチンは一般的に中和抗体誘導能が低いため、これを高める工夫が必要である。従って、本研究は、(1)近年の日本におけるJEV自然感染の疫学調査、及び(2)デング4価DNAワクチンの作製及び効果を高める投与法の検討、を行った。

B. 研究方法

自然感染率は、国立感染症研究所血清バンクより分与された血清を用いて、JEVのNS1に対する抗体を検出することにより推定した。この血清は、福岡、宮崎、愛知、長野、山梨、福島、山形及び秋田県の住民から2001年に採取されたものである。また、デング4価DNAワクチンの作製には、prM/E遺伝子戦略に基づいた、BALB/cまたはddYマウスを用いて、針無注射法で投与した。タンパクワクチンとして、デング2型ウイルス細胞外粒子及び日本脳炎不活化ワクチンを用いた。

(倫理面への配慮)

本研究は、神戸大学大学院医学系研究科医学倫理委員会及び動物実験委員会の許可を受けて行った。

C. 研究結果

1,764検体におけるNS1抗体陽性率は、0.5-6.7%（全体では4.4%）であった。これに基づ

き、NS1抗体保有期間（2年）で算出される年間自然感染率は0.2%-3.4%であった。南ほど高い傾向を示した。また、デング4価DNAワクチンを作製し、マウスにデング1型から4型全てに対する中和抗体を誘導することを証明した。さらに、タンパクワクチンとの混合投与が、中和抗体誘導能を効率よく上昇させることを示した。

D. 考察

日本の住民は近年でも比較的高い率で自然感染を受けていることが示された。この率は、厚生労働省による2000年度の感染症流行予測調査の中のJEV感受性調査で得られた年齢依存の抗体陽性率から推定される自然感染率に近似する。ワクチン接種率は低下しているため、早期の勧奨接種再開が望まれる。一方、prM/E遺伝子戦略に基づくデング4価DNAワクチンの作製は世界初である。タンパクワクチンとの混合投与は、人々が容認しうる程度にまでDNA量を低下させるために有効な方法と考えられる。

E. 結論

(1)JEV自然感染率は近年でも比較的高い、(2)デング4価DNAワクチンの作製に成功し、タンパクワクチン混合投与法により中和抗体誘導能が上昇した。

F. 健康危険情報

特記すべき事項なし。

G. 研究発表

論文発表20編、学会発表33編

H. 知的財産権の出願・登録状況

国内特許

1. 名称「DNAワクチンの中和抗体誘導能を増強するタンパク・DNA同時投与法」（2003）

厚生労働科学研究費補助金（新興再興感染症研究事業）
分担研究総合報告書

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 奴久妻智代子（神戸市環境保健研究所 微生物部）
小杉紗織、山中敦史、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世界的な問題になっている。デングウイルスに対する感染防御のメカニズムはデングウイルスに対する中和抗体が主体と考えられており、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WHOにより進められている。ところが、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が、その原因は解明されていない。そこで、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）、軽鎖（L鎖）の可変領域を増幅させ、アミノ酸を推定した。これらの中で相補性決定領域（CDR）のアミノ酸配列の相同性を調べ、中和活性との相関について解析したところ、L鎖のCDRのアミノ酸配列はH鎖に比べて相同性が高い傾向を示し、L鎖のCDR1～3で共通配列がみられた。また、36クローンの中で比較的高い中和活性を示すクローンでグループ1とグループ2のどちらかに属しているものがあり、グループ1はL鎖のCDR1～3のアミノ酸配列が、グループ2はH鎖のCDR1,2のアミノ酸配列がほぼ一致していた。さらに、わずかなアミノ酸の違いで中和活性が急激に低下する例もみられたことからCDRのアミノ酸配列が中和活性を規定していることが明らかになった。

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、近年日本国内でもデングウイルス流行国からの帰国者でデング熱を発症した患者が増えてきている。そのため、輸入感染症としてのデング熱・デング出血熱の対策は重要である。

現在、WHOが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価ワクチンの臨床を進めているが、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

る中和抗体が感染防御の主体と考えられていることから、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、特に抗原と直接接する相補性決定領域（complementarity determining region, CDR）は変異が顕著で、この領域が中和活性を規定していると言われている。我々は、デング抗体そのもののアミノ酸配列を解析した報告はないことから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）、軽

鎖 (L 鎖) の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。これらの中で CDR のアミノ酸配列の相同性を調べ、中和活性との相関について解析した。

B. 研究方法

1. H_L 鎖可変領域の cDNA 合成

神戸大学で作製した 36 個のハイブリドーマから TRIZOL (GIBCO) を用いて RNA を抽出した。H 鎖の定常領域に対応する Antisense primer である MuIgV_H3 -2 と L 鎖の定常領域に対応する Antisense primer である Mu κ IgV_L3 -1 を用いて RT 反応を行い cDNA を合成した。RT 反応は 1 μ g 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°C:60min、70°C:15min 反応させ cDNA を合成した。

2. H_L 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 を混合したもので (表. 1)、一方、L 鎖可変領域の PCR は L 鎖可変領域に隣接する leader peptide に対応する 16 種類の Sense primer を混合したもので行った (表. 2)。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°C:1min、60°C:1min, 72°C:2min を 40 サイクル繰り返した後、72°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. アミノ配列の決定と CDR の比較

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、ABIPRISM 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。各クローンのアミノ酸配列を ClustalW multiple sequence alignment (DDBJ) にて比較し、相同性を最大に調整する操作を行った。これらのアミノ酸配列の中で抗体分子に抗原が結合する内面にあたり、抗体活性を規定する上で重要と言われている部位である CDR について比較した。H 鎖と L 鎖は CDR が各々 3 つあることが知られている。つまり、H 鎖の CDR1 はアミノ酸が 31~35 番目、CDR2 は 50~65 番目、CDR3 は 99~106 番目であった。一方、L 鎖の CDR1 はアミノ酸が 24~35 番目、CDR2 は 51~57 番目、CDR3 は 90~98 番目であった。これら CDR のアミノ酸配列を基に ClustalW を実行した後、系統樹である N-J tree を表示させた。

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_L 鎖可変領域の RT-PCR

神戸大学で作製した 36 個のハイブリドーマから RNA を抽出し H および L 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、すべてのクローンでバンドが検出できた。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,L 鎖可変領域の塩基配列

H 鎖と L 鎖可変領域の両方を含むバンドが検出できたクローンは Dengue 1 型が 3 クローン、2 型が 17 クローン、3 型が 6 クローン、4 型が 10 クローンであった。これらについて、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 IgGH,L 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,L 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. CDR のアミノ配列の比較と抗体活性との相関性

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。推定した 36 クローンのアミノ酸配列を ClustalW にて比較し、相同性を最大に調整する操作を行った後 (図. 2、3)、CDR について比較した。

その結果、L 鎖の CDR のアミノ酸配列は H 鎖に比べて相同性が高い傾向を示した (表. 3)。つまり、L 鎖の CDR1 は RASKSVSTSGYS の配列が 53%を、CDR2 は LIYLVSN の配列が 47%を、さらに CDR3 では YYCQHIREL の配列が 50%を占めた。一方、H 鎖の CDR のアミノ酸配列はクローン間で一致するものも 2,3 みられたが、L 鎖の CDR と比較してその差異は顕著であった。なお、H 鎖の CDR3 のアミノ酸配列については相同性を最大に調整したことにより生じるギャップが多数存在したために解析から除外した。

さらに、総合的に比較するために H 鎖の CDR1,2 と L 鎖の CDR1~3 のアミノ酸配列を連結させて ClustalW を実行後、系統樹である N-J tree を表示させ、各クローンのアミ

ノ酸配列と中和活性との相関性について検討した (図. 4)。その結果、比較的高い中和活性を示すクローンはグループ 1 (D3-II-4H8, D3-II-7A3, D4-I-11D11) とグループ 2 (D2-III-10C7, D2-II-1B3, D2-V-10F1) に属していた。各グループの中のアミノ酸配列の相同性を調べたところ、グループ 1 は L 鎖の CDR1~3 のアミノ酸配列が、グループ 2 は H 鎖の CDR1,2 のアミノ酸配列が一致していた。また、わずかなアミノ酸の違いで中和活性が急激に低下する例として、D2-V-10F1 では 18,000 の中和活性を示していたものが、L 鎖の CDR1 の 2 つのアミノ酸 (25 番目が A→T, 27 番目が R→Q) のみが変わった D2-III-10G7 では中和活性が 320 にまで低下したことが興味深く思われた。

D. 考察

従来、 Dengue 熱・ Dengue 出血熱は熱帯・亜熱帯地域において深刻な社会問題となっていることから、世界的にはワクチン接種による予防対策が強く求められている。一方、今のところ日本国内で Dengue 熱・ Dengue 出血熱の感染は報告されていないが、近年毎年のように Dengue ウイルス流行国からの帰国者の中で Dengue 熱を発症する患者が報告され、輸入感染症として問題となっている。

Dengue 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、 Dengue 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、WHO により 4 つの型それぞれに対して中和抗体を誘導する弱毒 Dengue 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。

本研究において、 Dengue 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,L 鎖可変領域を増幅させ、PCR 産物を TA クローニングすることで H,L 鎖可変領域の full-length のアミノ酸配列を決定した。これらのアミノ酸配列の中で抗体分子に抗原が結合する

内面にあたり、抗体活性を規定する上で重要と言われている部位である CDR について焦点を合わせて解析したところ、L 鎖の CDR のアミノ酸配列は H 鎖に比べて相同性が高い傾向を示し、L 鎖の CDR1 は RASKSVSTSGYS の配列が、CDR2 は LIYLVSN の配列が、さらに CDR3 では YYCQHIREL の配列が共通配列であると考えられた。従来は H,L 鎖可変領域の CDR のアミノ酸配列の変異は同程度であると報告されていたが、本研究のデング抗体に関しては変異は H 鎖可変領域の CDR でより顕著であることが明らかになった。

さらに、比較的高い中和活性を示すクローンはグループ1とグループ2のどちらかに属していた。各グループの中のアミノ酸配列の相同性を調べたところ、グループ1はL鎖のCDR1~3のアミノ酸配列が、グループ2はH鎖のCDR1,2のアミノ酸配列が一致していた。また、わずかなアミノ酸の違いで中和活性が急激に低下する例もみられたことから CDR のアミノ酸配列が中和活性に影響していることが明らかになった。

本研究の CDR のアミノ酸配列のデータと中和抗体陽性であっても発症する患者の抗体 CDR のアミノ酸配列を比較することでワクチンが実用化される上での問題点が絞り込めるものと期待される。

E. 結論

本研究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)、軽鎖 (L 鎖) の可変領域を増幅させ、アミノ酸を推定した。これらの中で CDR のアミノ酸配列の相同性を調べ、中和活性との相関について解析したところ、L 鎖の CDR のアミノ酸配列は H 鎖に比べて相同性が高い傾向を示し、L 鎖の CDR 1~3 で共通配列がみられた。また、36 クローンの中で比較的高い中和活性を示すクローンでグループ1とグループ2に属しているものがあり、グループ1はL鎖のCDR1~3のアミノ酸配列が、グループ2はH鎖のCDR1,2のアミノ酸配列が一致していた。さらに、わずかなアミノ酸の違いで中和活性が急激に低下する例もみられたことから CDR のアミノ酸配列が

中和活性に影響していることが明らかになった。

F. 研究発表

1. 論文発表

Murakami, M., Ota, T., Nukuzuma, S., and Takegami, T. (2005): Inhibitory effect of RNAi on Japanese encephalitis virus replication in vitro and in vivo. *Microbiol Immunol*, 49, 1047-1056.

2. 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

奴久妻聡一、小杉紗織、山中敦史、小西英二. 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. 第53回日本ウイルス学会. (横浜) 11月. 2005年

村上学、奴久妻聡一、竹上勉. JEV 感染マウスにおける RNAi によるウイルス増殖抑制効果. 第53回日本ウイルス学会. (横浜) 11月. 2005年

竹上勉、村上学、劉寧、奴久妻聡一. 日本脳炎ウイルス持続感染における非構造蛋白 NS4a 及び 3'-UTR の生物学的役割. 第53回日本ウイルス学会. (横浜) 11月. 2005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 -GGGAATTCATG	RASTTSKGGYTMARCTKGRTT-3
MuIgVH5 -B	5 -GGGAATTCATG	RAATGSASCTGGGYWYCTCTT-3
MuIgVH5 -C-1	5 -ACTAGTCGACATG	GACTCCAGGCTCAATTTAGTTTTCT-3
MuIgVH5 -C-2	5 -ACTAGTCGACATG	GCTGTCYTRGBGCTGYTCYCTG-3
MuIgVH5 -C-3	5 -ACTAGTCGACATG	GVTTGGSTGTGGAMCTTGCYATTCCT-3
MuIgVH5 -D-1	5 -ACTAGTCGACATG	AAATGCAGCTGGRTYATSTTCTT-3
MuIgVH5 -D-2	5 -ACTAGTCGACATG	GRCAGRCTTACWYTYTCATTCT-3
MuIgVH5 -D-3	5 -ACTAGTCGACATG	ATGGTGTTAAGTCTTCTGTACCT-3
MuIgVH5 -E-1	5 -ACTAGTCGACATG	GGATGGAGCTRTATCATSYTCTT-3
MuIgVH5 -E-2	5 -ACTAGTCGACATG	AAGWTGTGGBTRAACTGGRT-3
MuIgVH5 -E-3	5 -ACTAGTCGACATG	GRATGGASCKKIRTCTTTMTCT-3
MuIgVH5 -F-1	5 -ACTAGTCGACATG	AACTTYGGGYTSAGMTTGRIT-3
MuIgVH5 -F-2	5 -ACTAGTCGACATG	TACTTGGGACTGAGCTGTGTAT-3
MuIgVH5 -F-3	5 -ACTAGTCGACATG	AGAGTGCTGATTCTTTTGTG-3
MuIgVH5 -F-4	5 -ACTAGTCGACATG	GATTTTGGGCTGATTTTTTTTATTG-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

表2. 抗体 L 鎖可変領域の RT-PCR のプライマー

Sense primers (16)

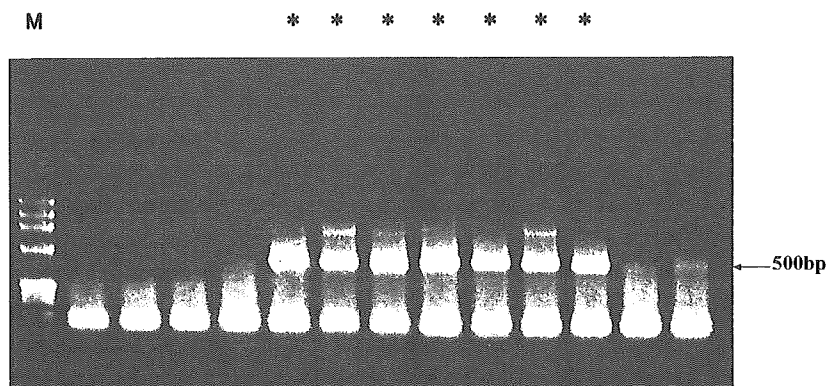
MuI κ VL5 -A	5 -GGGAATTC	<u>ATG</u>	RAGWCACAKWCYCAGGTCTTT-3
MuI κ VL5 -B	5 -GGGAATTC	<u>ATG</u>	GAGACAGACACACTCCTGCTAT-3
MuI κ VL5 -C	5 -ACTAGTCGAC	<u>ATG</u>	GAGWCAGACACACTSCTGYTATGGGT-3
MuI κ VL5 -D-1	5 -ACTAGTCGAC	<u>ATG</u>	GAGGRCCCCTGCTCAGWTTYTTGGIWTCTT-3
MuI κ VL5 -D-2	5 -ACTAGTCGAC	<u>ATG</u>	GGCWTCAAGATGRAGTCACAKWYYCWGG-3
MuI κ VL5 -E-1	5 -ACTAGTCGAC	<u>ATG</u>	AGTGTGCYCACTCAGGTCTGGSGTT-3
MuI κ VL5 -E-2	5 -ACTAGTCGAC	<u>ATG</u>	TGGGGAYCGKTTYAMMCTTTTCAATTG-3
MuI κ VL5 -E-3	5 -ACTAGTCGAC	<u>ATG</u>	GAAGCCCCAGCTCAGCTTCTCTCC-3
MuI κ VL5 -F-1	5 -ACTAGTCGAC	<u>ATG</u>	GAGIMMKTICIMTTCAITTCYTGGG-3
MuI κ VL5 -F-2	5 -ACTAGTCGAC	<u>ATG</u>	AKGTHCYCIGCTCAGYTYCTIRG-3
MuI κ VL5 -F-3	5 -ACTAGTCGAC	<u>ATG</u>	GTRTCCWCASCTCAGTTCCTTG-3
MuI κ VL5 -F-4	5 -ACTAGTCGAC	<u>ATG</u>	TATATATGTTTGTGTCTATTTCT-3
MuI κ VL5 -G-1	5 -ACTAGTCGAC	<u>ATG</u>	AAGTTGCCTGTTAGGCTGTTGGTGCT-3
MuI κ VL5 -G-2	5 -ACTAGTCGAC	<u>ATG</u>	GATTTWCARGTGCAGATTWTCAGCTT-3
MuI κ VL5 -G-3	5 -ACTAGTCGAC	<u>ATG</u>	GTYCTYATVTCCTTGCTGTTCTGG-3
MuI κ VL5 -G-4	5 -ACTAGTCGAC	<u>ATG</u>	GTYCTYATVTTRCTGCTGCTATGG-3

Antisense primer (1)

MuI κ VL3 - 1 5 -CCCAAGCTTACTGGATGGTGGGAAGATGGA-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

図2. H鎖可変領域のアミノ酸配列の比較 (CLUSTAL W multiple sequence alignment)

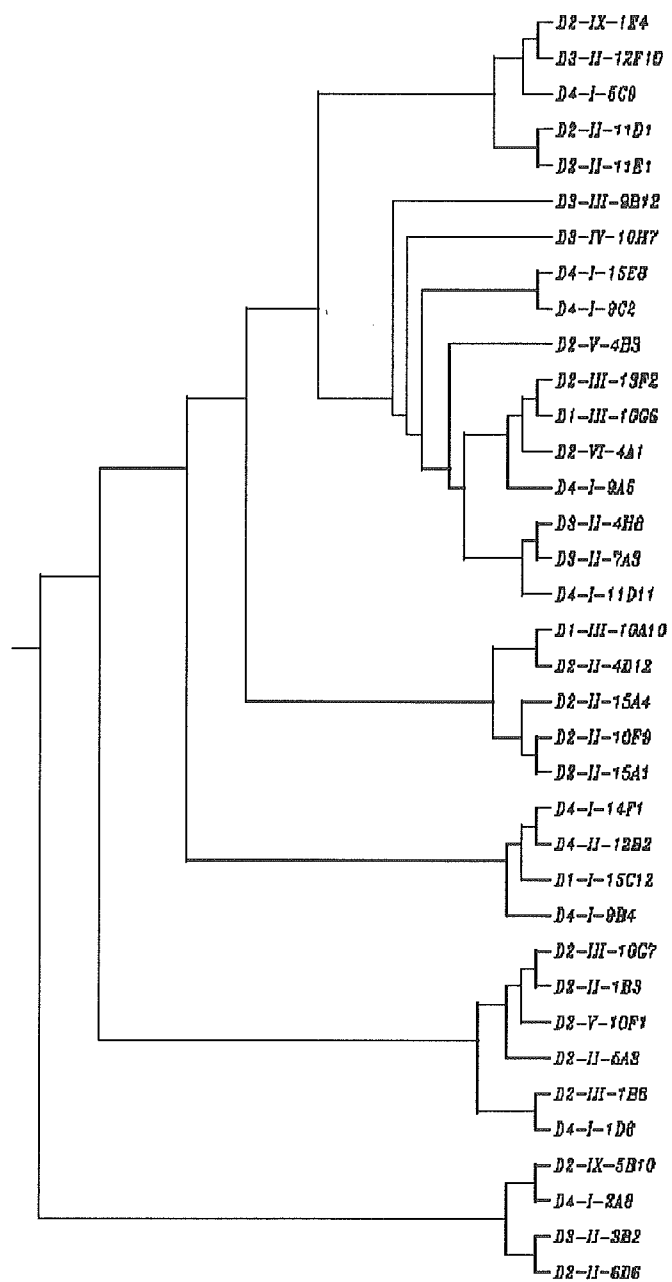
```

                                1                               31 35
D3-11-12F10  MNFGLRLIFLALILKGVQCEVQLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTFSTYAMSWVRQTP
D2-11-11D1   MDSRLNLVFLALILKGVQCEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFSSYGMSWVRQTP
D2-1X-5B10   MAVLGLLLCLVTFPSCVLSQVQLKESGPGLVAPSQSLSICTVSGFSLTTYGVNWRQPP
D2-11-10F9   MKWTWVFLFILSGTAGVHSQVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYTFDYVLSWVKQRT
D2-V-4B3     MGWSYIMLFLLSVTAGVHSQVQLQQSAAELARPGASMKMSCKASGYTITNYTMHWVKQRP
D3-11-4H8    MKCSWVMFFLVATATGVHSQVQLQQSGAELVRPGVSVKISCKGAGYTFDYSMHWVKQSH
D1-1-15C12   MGWVWNLFLMAAAQSIIQAQIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYTFDYSMHWVKQAP
*   . :      . : : * * : * * . : : : * : * : * : * : * : * : *
                                50                               65                               99
D3-11-12F10  EKRLWVATISSGRSYTFYPD—KGRFTISRDNAKSTLYLQMSLSRSEDAMYYCARHGE
D2-11-11D1   DKRLELVATINSNGGTTYYPDSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMSLSKSEDAMYYCARD—
D2-1X-5B10   GKGLEWLVGIWGD—GSTKYHSALISRLSIKDNSKQVFLKLNLSLQDDTATYYCARF—
D2-11-10F9   GGGLEWIGEIPGSGSTYYNGFKGKATLTADKSSNTAYMQLSSLTSEDSAVYFCARSHY
D2-V-4B3     GGGLEWIGYINPSSGYTEYNQKFKDKTTLADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARENY
D3-11-4H8    AKSLEWIGVISTYYGDARYNQKFKGKATMTVDKSSSTAYMELARLTSEDSAIYYCARGVT
D1-1-15C12   GKGLKWMGWINTETAEPYAADFKGRFVFLKTSASIAYLQINNLKNEDTATYFCARLDR
* : . : * . . * . : : . . . : : : * . : * * * * *
                                106
D3-11-12F10  YGN-FWFAYWGGTTLTVSAAKTPPPVYPLAPGS
D2-11-11D1   KGW-DYFDYWGGTTLTVSSAKTTPPSVYPLVPGS
D2-1X-5B10   -AN-YFDYWGGTPLTVSSAKTTPPVYPLAPGS
D2-11-10F9   YVS-GYFDYWGGTTLTVSSAKTTPPPVYPLAPGS
D2-V-4B3     GSR--YFDVWGAGTTTVSSAKTTPPPVYPLAPGS
D3-11-4H8    TRG--YFDYWGGTTLTVSSAKTTPPPVYPLAPGS
D1-1-15C12   FDVG—PYWGGTTLTVSAAKTPPPVYPLAPGS
* * * * : * * * : * * * * . * * * * . * * *

```

CDR1 : aa31~35
 CDR2 : aa50~65
 CDR3 : aa99~106

図4. CDRのアミノ酸配列を基にして作成した系統樹 (N-J tree)



H15-17 総合研究報告書

日本脳炎ウイルスに対する免疫の
西ナイルウイルスに対する交差中和に関する研究
西ナイルウイルスおよび日本脳炎ウイルス DNA ワクチンの作製と免疫原性、粘膜免疫法に関する研究

分担研究者 只野昌之（琉球大学大学院・医学研究科・病原生物学分野）

研究要旨：H15年度）沖縄島および石垣島の住民から得られた血清について、日本脳炎ウイルス（JEV）と西ナイルウイルス（WNV）を用いた中和試験を行い、JEV 免疫レベルと WNV 交差中和能の関係を検討した。H16年度）JEV と WNV に対する DNA ワクチン候補を作製し、マウス免疫実験でホモのウイルスに対する免疫応答のみならず、ヘテロのウイルスに対する交差中和抗体の誘導能についても検討した。H17年度）DNA ワクチンの経口投与法を確立するために、バキュロウイルスの発現系で作製した E 型肝炎ウイルスのウイルス様中空粒子（HEV-VLPs）に DNA ワクチン候補を封入し、培養細胞レベルで遺伝子導入できるか否かを検討した。

A. 研究目的

ヒト用の WNV ワクチンが未だ認可されていないことや、わが国では既に JEV ワクチンが普及していることから、JEV に対する免疫が WNV の感染を防御するか否かについては興味を持たれる。そこで、JEV に対する免疫の WNV に対する交差中和の程度を知るために、JEV の侵淫度の高い地域と低い地域の住民血清について JEV と WNV を用いた中和試験を実施した。さらに、両ウイルスに対する DNA ワクチン候補を作製し、ワクチンとしての可能性を検討すると共に、それぞれのワクチン候補による免疫実験でも交差中和抗体が誘導されるか否かを検討した。経口投与可能な DNA ワクチンの開発のために、腸管から感染するウイルスである HEV の VLPs に DNA ワクチン候補を封入し、培養細胞での遺伝子導入効果を検討した。

B. 研究方法

1985年から1991年に沖縄県下で集められた住民血清について、JEV（ワクチン株、沖縄分離株）と WNV（FCG 株、NY 株）を用いて中和試験を実施した。JEV（JaOH0566 株）および WNV（NY 株）のエンベロープ構成蛋白遺伝子 cDNA を pCMV に組み込んで各々の DNA ワクチン候補を作製し、培養細胞における発現確認、マウス免疫原性、免疫マウスにおける感染防御を検討した。HEV-VLPs を

発現するバキュロウイルスの感染培養上清から VLPs を精製し、DNA ワクチン候補を封入して細胞への遺伝子導入効果を検討した。

（倫理面への配慮）

用いられた住民血清は既に別の研究に用いられ、論文にも発表されている。遺伝子組み換えについては当該機関の委員会の承諾を得ている。WNV の取り扱いは全て長崎大学および当該機関の P3 施設で行った。

C. 研究結果

JEV の侵淫度が高い地域の住民血清は高率に WNV を中和したが、殆どワクチン免疫しか受けていないような地域の住民血清の WNV 交差中和抗体保有率は低かった。作製された DNA ワクチン候補は培養細胞中で目的の蛋白質を発現した。DNA ワクチンを接種したマウスでは、強く長期間の免疫が誘導され、ウイルスの致死感染も完全に防御した。また、各々のワクチンで免疫したマウスの血清中には、もう一方のウイルスに対する中和抗体も検出された。DNA ワクチンを封入した HEV-VLPs には培養細胞への遺伝子導入能が認められ、経口 DNA ワクチン開発の目処がついた。

D. 考察

JEV の侵淫度が高い地域の住民血清のおよそ半数が WNV を交差中和したが、侵淫度の低い地域の住民血清で

交差中和が認められたのは約 1/4 と少なかったのは前者では自然感染で強く免疫されているためと考えられた。DNA ワクチンの免疫実験でも交差中和抗体の産生が確認されたことから、DNA ワクチンは現行の JEV ワクチンとは異なり、より感染免疫に近い免疫が誘導されると思われた。

E. 結論

完全ではないが、JEV 侵淫度の高い地域の住民は自然感染による強い免疫で、ある程度 WNV の感染から防御されると思われた。また、現行の JEV ワクチンによる免疫では、その効果は低い。DNA ワクチンによる免疫は現行ワ

クチンと異なり、交差中和抗体も誘導されることから実用性は高いと考えられる。また、腸管感染ウイルスの VLPs に封入することで、粘膜からのアプローチも可能であると思われた。

F. 健康危険情報

特記すべき事項なし

G. 研究発表

スペースの関係で省略

H. 知的財産の出願・登録状況

なし

研究成果の刊行に関する一覧

発表者氏名	論文タイトル	発表誌名	巻	頁	出版年
Ma SP, Yoshida Y, Makino Y, Tadano M, Ono T, Ogawa M.	A major genotype of Japanese encephalitis virus currently circulating in Japan.	Am J Trop Med Hyg.	69	151-4	2003
Mori Y, Okabayashi T, Yamashita T, Zhao Z, Wakita T, Yasui K, Hasebe F, Tadano M, Konishi E, Moriishi K, Matsuura Y.	Nuclear localization of Japanese encephalitis virus core protein enhances viral replication.	J Virol.	79	3448-58	2005
Tang WF, Eshita Y, Tadano M, Morita K, Makino Y.	Molecular basis for adaptation of a chimeric dengue type-4/Japanese encephalitis virus to Vero cells.	Microbiol Immunol.	49	285-94	2005
Matsuda T, Almasan A, Tomita M, Tamaki K, Saito M, Tadano M, Yagita H, Ohta T, Mori N.	Dengue virus-induced apoptosis in hepatic cells is partly mediated by Apo2 ligand/tumour necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand.	J Gen Virol.	86	1055-65	2005
Harakuni T, Sugawa H, Komesu A, Tadano M, Arakawa T.	Heteropentameric cholera toxin B subunit chimeric molecules genetically fused to a vaccine antigen induce systemic and mucosal immune responses: a potential new strategy to target recombinant vaccine antigens to mucosal immune systems.	Infect Immun.	73	5654-65	2005

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症事業）
総括研究報告書

新規ワクチン開発を目指したウエストナイルウイルスのリバースジェネティクス法の
確立に関する研究

分担研究者 前田 秋彦 北海道大学大学院獣医学研究科・助教授

研究要旨 節足動物媒介性感染症の多くは、蚊やダニが媒介する動物由来感染症（人獣共通感染症、人畜共通感染症）であり、医学のみならず獣医学領域においても重要な感染症の一つである。特に、フラビウイルス科のウイルスによって引き起こされる蚊が媒介する感染症である日本脳炎（JE）やウエストナイル（WN）脳炎はヒトばかりでなく、野生動物や産業動物においても注意を要する感染症である。WN 脳炎は、一例の米国からの帰国患者以外は、日本における発生の報告はないが、輸入感染症として日本への侵入が危惧されており、その対策が急がれる。現在のところ、ウマ用の WN ウイルス（WNV）に対するワクチン以外は認可されたワクチンはなく、ヒトに対する良い WNV に対するワクチンは存在しない。そこで私たちは、分担研究課題として、新規ワクチンの開発を目指した「WNV のリバースジェネティクス法の確立」と、より安全なワクチンを製造するために、「無血清培養 Vero E6 細胞での WNV の増殖」に関する研究を行った。

分担研究者

前田 秋彦 （北海道大学大学院獣医学
研究科・助教授）

協力研究者

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）

倉根 一朗 （国立感染症研究所・部長）

荻野 倫子 （東北大学医学部・助手）

堀内 基広 （北海道大学大学院獣医学
研究科・教授）

1. WNV のリバースジェネティクス法の
確立に関する研究

近年、ウイルスのリバースジェネティクス法はウイルス学的解析ばかりでなく、新規ワクチンの開発や感度の良い検査法の開発のための強力なツールとして使用されつつある。私達は WNV のリバースジェネティクス法を確立し、WNV に

対する簡便で高感度な検査法の開発と、安全で効果的なヒトや動物への抗 WNV ワクチンを開発することを目的として、本研究課題について検討した。ウイルスの核酸から、ウイルスの殻のみでウイルスに由来する遺伝子を含まない SvPs や、ウイルスの殻の中にウイルスの構造蛋白質を欠くウイルス遺伝子を含むウイルス様粒子（VLP）、リバースジェネティクス法による組み換えウイルスの作製を試みた。その結果、WNV の NY 株、Eg101 株に由来する SvPs を作製（SvPs の発現ベクターに構築）出来たため、本システムを利用した新たな診断法、検査法の開発が期待される。また、ウイルスの VLP の作製に使用するレプリコン RNA の作製にも成功した。レプリコン RNA は、VLP 作製の第一段階であり、またその発展が期待される。実際、他のウイルスでは、作製した VLP を用いて、ウイルスの感受性細胞の選抜や感染メカニズムの解明に使用している。更に、ウイルスゲノムの

完全長 cDNA クローンの作製を試みた。しかし、残念ながら、完全な形の WNV cDNA クローンの作製は困難であった。その理由は、大腸菌細胞を使用したクローニングの段階で、ウイルスの E と NS1 蛋白質をコードする遺伝子が不安定であり、欠損や変異、大腸菌遺伝子の挿入が起こるためであった。しかし、これら変異の入ったクローンは大腸菌の中で安定に維持されたため、(大腸菌遺伝子の挿入はあるが) WNV の全ての遺伝子を含むクローンを利用して、組み換えウイルスの作製を試みた。すなわち、平成 16 年度に確立した PCR を基盤とした組み換えウイルス作製システムを利用した。その結果、培養細胞において継代可能なウイルス様物質の産生が認められた。これが、組み換えウイルスであることの確認実験が必要である。もし、電子顕微鏡等により、ウイルス粒子の産生が確認されれば、本システムを利用することによって、任意の部位に変異を導入した組み換え WNV の作製が可能となる。今後は、本システムを更に改善して、WNV の病原性の発現機構を調べるとともに、弱毒で安全なワクチン候補株の作製と選別を行う予定である。

2. 無血清培養 Vero E6 細胞での WNV の増殖に関する研究

培養細胞系を用いてワクチン株を製造する場合に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。現行の培養細胞を用いたワクチン製造方法では、使用する血清中に存在する各種の

刺激物質による生体の副反応や、BSE プリオンを含む各種病原体の混入の危険性について問題となっている。本研究課題においては、WNV のワクチン株の製造を考慮して、Vero E6 細胞の無血清培養への馴化と、馴化細胞における WNV の感染実験を行った。

無血清培地に馴化させた Vero E6 細胞 (E6/SFM) を用いて、WNV の増殖能について検討した。10% 牛胎仔血清 (FCS) を含む培地で培養している細胞 (E6) に WNV を感染させた場合、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、ウイルスの増殖効率が良かった。更に、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。本結果は、E6/SFM 細胞を用いることで、高力価で純度の高い WNV の抗原を精製できることが期待できる。更に、この無血清培養系を利用することで、より安全なワクチンを製造できることが期待される。

以上の結果より、私達の研究成果は、今後の WNV の新規検査法の確立や新規ワクチンの開発に発展させることが期待できる。また、本研究により確立した方法を使用することで、WNV の生物学的研究を推進し、WNV 感染症の病原性発現メカニズムを解明出来るものと考えられる。私たちは、これらの研究を通して、WNV 感染症対策法の確立に貢献できるものと考えている。

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
Eiji Konishi, Aya Terazawa and Jun-ichi Imoto	Simultaneous immunization with DNA and protein vaccines against Japanese encephalitis or dengue synergistically increases their own abilities to induce neutralizing antibody in mice	<i>Vaccine</i>	21	1826-1832	2003
Kiyoshi Tanabayashi, Ryozauro Mukai, Akio Yamada, Tomohiko Takasaki, Ichiro Kurane, Masaoki Yamaoka, Aya Terazawa, and Eiji Konishi	Immunogenicity of a Japanese encephalitis DNA vaccine candidate in cynomolgus monkeys	<i>Vaccine</i>	21	2338-2345	2003
Chiyoko Nukuzuma, Naoko Ajiro, Carl J. Wheeler, and Eiji Konishi	Enhancing effect of Vaxfectin on the ability of a Japanese encephalitis DNA vaccine to induce neutralizing antibody in mice	<i>Viral Immunology</i>	16	183-189	2003
Eiji Konishi, Naoko Ajiro, Chiyoko Nukuzuma, Peter W. Mason, and Ichiro Kurane	Comparison of protective efficacies of plasmid DNAs encoding Japanese encephalitis virus proteins that induce neutralizing antibody or cytotoxic T lymphocytes in mice	<i>Vaccine</i>	21	3675-3683	2003
Eiji Konishi, Aya Terazawa and Atsuko Fujii	Evidence for antigen production in muscles by dengue and Japanese encephalitis DNA vaccines and a relation to their immunogenicity in mice	<i>Vaccine</i>	21	3713-3720	2003
Eiji Konishi, Mizue Shoda and Takashi Kondo	Prevalence of antibody to Japanese encephalitis virus nonstructural 1 protein among racehorses in Japan: indication of natural infection and need for continuous	<i>Vaccine</i>	22	1097-1103	2004