

	nucleoprotein detection of authentic Marburgvirus.				
<u>Saijo M</u> , Ami Y, Suzaki Y, Nagata N, Iwata N, Hasegawa H, Ogata M, Fukushi S, Mizutani T, Sata T, Kurata T, <u>Kurane I</u> , Morikawa S.	Highly attenuated vaccinia vaccine, LC16m8, lacking B5R membrane protein expression protects monkeys from monkeypox.	Journal of Virology	80	5179-5188	2006
H. Katano, Y. Sato, Y. Tsutsui, T. Sata, A. Maeda, N. Nozawa, <u>N. Inoue</u> , Y. Nomura, T. Kurata.	Pathogenesis of cytomegalovirus-associated labyrinthitis in a guinea pig model.	Microbes and Infection	9	183-191	2007
Kiyotani, K., T. Sakaguchi, <u>A. Kato</u> , Y. Nagai, T. Yoshida.	Paramyxovirus Sendai virus V protein counteracts innate virus clearance through IRF-3 activation, but not via interferon, in mice.	Virology	359	82-91	2007
<u>Kato, A.</u> , K. Kiyotani, T. Kubota, T. Yoshida, M. Tashiro, and Y. Nagai.	Importance of anti-Interferon capacity of the Sendai virus C protein for pathogenicity in mice.	Journal of Virology	81		in press, 2007

## 狂犬病ウイルスベクターの一アミノ酸置換による病原性復帰の解析

主任研究者：森本金次郎（国立感染症研究所 ウイルス第一部）

協力研究者：伊藤 睦代（国立感染症研究所 ウイルス第一部）

研究要旨：狂犬病ウイルス固定毒株において表面糖蛋白質である G 蛋白質の 333 位のアミノ酸が成マウスでの病原性に関与していることが分かっている。病原性をもつ株のこの部位はアルギニンであり、それをグルタミンに置換すると病原性が著しく減衰することが知られている。このような一アミノ酸置換による病原性の減弱はモノクローン抗体によるエスケープ突然変異株の解析やリバーシジェネティクスによる点変異株の作製により解析されてきた。我々が狂犬病ウイルスベクターとして開発したベクター株は非常に病原性の減弱した HEP-Flury 株を基に作製したクローンウイルス (rHEP 株) であり、その G 蛋白質の 333 位のアミノ酸はグルタミンである。我々のベクターの G 蛋白質の 333 位をアルギニンに変化させた場合、どのような病原性の変化が起こるかを調べておくことはこの狂犬病ウイルスベクターの安全性を考えるうえで、重要な問題である。本研究において、rHEP 株の G 蛋白質の 333 位のアミノ酸をグルタミンからアルギニンに変化させた株 (rHEP<sup>333R</sup>) をプラスミド上で点変異を導入し、リバーシジェネティクスにより作製し、その病原性の変化と免疫応答の変化を調べた。

### A. 研究目的

狂犬病ウイルスの粒子表面糖蛋白質である G 蛋白質は宿主細胞のリセプターに結合し、膜融合を誘導する役割を担っていることから、細胞への吸着、侵入、神経細胞間の伝播に関与する。さらに、ウイルス中和抗体の主要なターゲットとなることから、狂犬病ウイルスの病原性を決定する最も重要な蛋白質である。

様々な G 蛋白質に対するモノクローナル抗体のエピトープの解析とそれら抗体に対するエスケープ変異株の解析より、G 蛋白質の 333 位のアミノ酸が成マウスの脳内接種における病原性に関与している

ことが明らかとなってきた。即ち、333 位のアミノ酸がアルギニンやリジンの正電荷のアミノ酸であれば、病原性を発揮するが、グルタミン、イソロイシン、グリシン、メチオニン等に変化すると病原性を消失した。さらに、333 位のアミノ酸が末梢から中枢神経への浸入やウイルスの細胞間伝播に関与していることも示された。

狂犬病ウイルスの固定毒株（実験室株）において、その株により様々なレベルの病原性を呈する。CVS 株や Nishigahara 株は脳内接種と末梢接種において、成マウスを殺す病原性をもつ。ERA 株、PV 株、



LEP-Flury 株などは脳内接種では病原性をもつが、末梢接種においては殆ど病原性を示さない。さらに、最も病原性の減弱した株として、HEP-Flury 株や RC-HL 株があり、これらの株は脳内接種と末梢接種においても成マウスを殺すことはない。

RC-HL 株は Nishigahara 株から培養細胞で継代を繰り返すことにより得られた弱毒株であるが、G 蛋白質の 333 位のアミノ酸はアルギニンのままであることが分かった。このことは 333 位のアミノ酸以外にも病原性の減弱に関与する部位が存在することを示唆している。

HEP-Flury 株 (high-egg-passage Flury strain) は日本においてヒト用ワクチン製造に使用されている株であり、LEP-Flury 株 (low-egg-passage Flury strain) をさらに鶏卵継代を長く続けた病原性のさらに減弱した株で、LEP-Flury 株は 333 位のアミノ酸はアルギニンであるが、HEP-Flury 株はグルタミンに変化していることが分かっている。両株間の G 蛋白質には 8 アミノ酸の違いがある。そこで、本研究において 333 位のアミノ酸の変化がどの程度の病原性の変化をもたらすかを、リバーズジェネティクスにより、グルタミンからアルギニンに変異させた株を作製して、両株の病原性の違いを解析した。

## B. 研究方法

### G 蛋白質の 333 位にアルギニンをもつ HEP 株 (rHEP<sup>333R</sup>) の作製

HEP 株完全長 cDNA プラスミド (pHEP) の G 蛋白質の 333 位に相当するコドンに CAG から CGG に点変異を導入することにより、グルタミンからアルギニンに変化させたウイルス cDNA (pHEP<sup>333R</sup>) を作製し、我々のリバーズジェネティクスの系によりウイルス株 (rHEP と rHEP<sup>333R</sup>) を作製した。作製したウイルスのゲノムは変異を導入した領域の塩基配列を確認することにより、G 蛋白質の 333 位がグルタミンからアルギニンに置換していることを確かめた。

### ウイルス力価測定

ウイルスの培養細胞での増殖性はマウス神経芽腫細胞 (NA) を用いて、ウイルス 10 倍希釈液による感染細胞のフォーカス数を蛍光抗体法により観察し、FFU/ml (focus forming unit per ml) として計算した。

### 狂犬病ウイルスの脳内接種とマウス脳の採取

6 週齢 ICR マウスに 10<sup>5</sup> ffu/0.03 ml の rHEP 株あるいは rHEP<sup>333R</sup> 株を脳内接種し、14 日間マウスの病態を観察した。50% lethal dose (LD<sub>50</sub>) は連続して 10 倍希釈したウイルス液の接種によるマウスの生死を観察、Reed and Muench 法により計算した。マウス脳内でのウイルス力価は C57BL/6 感染マウス脳を取り出し、10% の PBS 懸濁液とし、ウイルス力価試験に供した。

### 感染マウス血清中の中和抗体価の測定

rHEP 株あるいは rHEP<sup>333R</sup> 株感染マウスの血清中の中和抗体は RFFIT (rapid fluorescent focus inhibition test) による血清の連続 4 倍希釈液とウイルス懸濁液を 37°C、1 時間処理したことによる、50% の感染フォーカス数の減少をもたらす希釈率を求め、WHO の国際標準品と比較し、IU (international unit) に換算した。

### 感染マウス脳内のウイルスゲノム RNA の測定

感染マウス脳内のウイルスゲノム RNA の定量はマウス脳より得た RNA を狂犬病ウイルス特異的配列をもつプライマー [N5-a: 5' -ATG GAT GCC GAC AAG ATT GT-3' ] を用いて、AMV Reverse Transcriptase XL により、逆転写反応を行い、もう一つのウイルス N 遺伝子特異的プライマー [N3-a: 5' -CCC ACT CTG ATT GCC GAA TA-3' ] とで、Takara Ex-Taq を用いて、94 °C 5 分後、30 サイクル (94 °C 30 秒、50 °C 30 秒、72 °C 1 分) に引き続き 72 °C 7 分の PCR を行った。脳内の標準遺伝子として

glyceraldehyde-3-phosphate



dehydrogenase (G3PDH) を特異的プライマー-G3PDH sense primer [5' -TGC CAA GGC TGT GGG CAA GGT CAT-3' ]と antisense primer [5' -AAC AGG GTG GTG GAC CTC ATG GCC-3' ]を用いて同条件で増幅させた。

#### 免疫組織染色

6週齢 C57BL/6 マウスに 105 ffu/0.03 ml の rHEP 株あるいは rHEP333R 株を脳内接種し、4日後 10% sucrose/PBS で灌流し、10% sucrose を含む 4% formaldehyde で固定し、脳を取り出した。脳サンプルは 30% sucrose/PBS 中で保管し、50  $\mu$ m の連続切片を作製した。ウイルス抗原の存在は anti-rabies N 抗体を用いた、avidin-biotin-peroxidase 法のより染色し、顕微鏡観察した。

#### C. 研究結果

##### 培養細胞での rHEP 株と rHEP<sup>333</sup>R 株の増殖

G 蛋白質の 333 位をアルギニンに置換したウイルス株 (rHEP<sup>333</sup>R) はリバースジェネティクスにより、作製した (図 1 上)。親株である rHEP 株と rHEP<sup>333</sup>R 株の NA 細胞での増殖曲線を図 1 下に示した。両株の増殖には有意な違いが見られなかった。NA 細胞においてはウイルス表面蛋白質の一アミノ酸の置換ではその吸着・侵入に影響を与えないと考えられる。ウイルス株における in vitro neurotropism index (神経細胞由来である NA 細胞と非神経細胞由来の BHK-21 細胞での感染しやすさの違いを対数値で表示) を比較したところ、rHEP 株はその値が 0、rHEP<sup>333</sup>R 株は 1.5 という値を示した。一般に病原性の強い株は in vitro neurotropism index が 1.0 以上の値を示す。rHEP<sup>333</sup>R 株は LEP-Flury 株 (1.7) や CVS 株 (1.5) と同程度の値を示すように変わっていた (表 1)。

##### マウスでの rHEP<sup>333</sup>R 株の病原性

rHEP 株と rHEP<sup>333</sup>R 株の成マウスでの病原性の変化を各々 10<sup>5</sup> ffu のウイルスを脳内接種することにより調べた。rHEP 株は若干の体重減少が見られたが、回復し、死に至るものはなかった (図 2 上)。一方、

rHEP<sup>333</sup>R 株感染マウスは神経麻痺を起こし、11 日以内に全て死んでしまった (図 2 下)。この結果は一アミノ酸の置換で病原性が復帰したことを示している。rHEP<sup>333</sup>R 株の LD<sub>50</sub> 値は 10<sup>-2.2</sup> となった。rHEP 株は 10<sup>6</sup> ffu のウイルスを接種してもマウスを殺すことはなかった。CVS 株の LD<sub>50</sub> 値は 10<sup>-0.2</sup> である。rHEP<sup>333</sup>R 株は CVS 株と比べるとまだ 100 倍以下の LD<sub>50</sub> 値であるが、明らかに病原性が現れている。

下肢筋肉内接種による、rHEP 株、rHEP<sup>333</sup>R 株、CVS 株の病原性を調べると rHEP 株と rHEP<sup>333</sup>R 株はマウスを殺すことはない。rHEP<sup>333</sup>R 株においては 6 匹中 1 匹に下肢麻痺を引き起こしたが、マウスを殺すことはなかった (図 3 上)。CVS 株は 8 日以内に全てのマウスを殺した (図 3 下)。

##### マウス脳内のウイルスの増殖と血清中の中和抗体価の測定

rHEP 株と rHEP<sup>333</sup>R 株の脳内での増殖能を調べた。rHEP 株は脳内では全く増殖していないが、rHEP<sup>333</sup>R 株は接種後 8 日をピークに 10<sup>5.3</sup> ffu まで増殖していることが示された (図 4 上)。マウス脳内でのウイルスゲノム RNA は RT-PCR により解析した (図 5)。その結果、rHEP<sup>333</sup>R 株では感染後 4、8、11 日において RNA の存在が確認できるが、rHEP 株の方は感染後 4 日に RNA の存在が確認できるが、16、20 日では RNA は検出されなかった。

狂犬病ウイルス感染において中和抗体が生体防御の重要な要因となっていることから、血清中の中和抗体を測定してみた。rHEP 株感染マウスにおいて、4 日後に既に 45 IU/ml の高い値を示し、以後 20 日間高い値を持続していた。一方、rHEP<sup>333</sup>R 株感染マウスにおいては感染後 4 日では 0.6 IU/ml という低い値を示した。以後 8 日後には 34 IU/ml に上昇するが、11 日には死んでしまった (図 4 下)。感染後期 (8 日後) での中和抗体の上昇は最早ウイルスの増殖による死から回復するには手遅れであるといえる。

#### D. 考察



狂犬病ウイルスのG蛋白質は宿主細胞への吸着・侵入、アポトーシスの誘導、免疫応答の誘導に関与していることが知られている。それ故、G蛋白質は狂犬病の病原性に最も重要な役割をもつ蛋白質である。さらに、その333位のアミノ酸がマウスでの病原性の変化に関与していることが報告されている。しかしながら、ウイルス株によっては病原性の変化には他の部位も関与していることも報告されている。本研究においては我々の研究室において遺伝子発現ベクターとして利用しているHEP株におけるこの333位の病原性の関与を調べた。

その結果、333位をアルギニンに置換させるとマウス脳内で増殖することが可能となり、病原性が現れることが確認された。狂犬病ウイルスの細胞側リセプターとしてニコチン性アセチルコリンリセプター(NAcChR)、神経細胞接着分子(NCAM)、ニューロトロフィンリセプター(p75NTR)が報告されている。既に、p75NTRのG蛋白質への結合が330位あるいは333位のリジン、アルギニンに依存していることが示されている。したがって、rHEP<sup>333R</sup>株のp75NTRへの結合が脳内での増殖に関与している可能性が高い。

CVS株は末梢感染においても、致死感染を引き起こすが、rHEP<sup>333R</sup>株はPV株やERA株同様、脳内感染では致死感染であるが、末梢感染では僅かに少数のマウスに麻痺を引き起こす程度である。この点からHEP株の333位の変化は神経細胞への侵入性には大きな関与をしてはいないと考える。

CVS株、rHEP<sup>333R</sup>株、rHEP株の感染ルートによる、LD<sub>50</sub>値を比較してみる(図6)。本研究において行ったHEP株のグルタミンからアルギニンへの置換により、脳内接種において、病原性が現れたが、その程度はCVS株と比べると百分の一少ないものであった。その他の感染ルート鼻腔接種(IN)、筋肉接種(IM)においても、CVS株よりそれぞれ百分の一少ない病原性の値を示した。このことは333位のアミノ酸以外にも病原性に関与する部位が存在することを示唆するものである。

脳内接種法はウイルスを注射器で直接

脳内に注入することから、中枢神経内の免疫状態をかき乱すとともに免疫反応を著しく刺激する接種法である。それ故、脳内での増殖、伝播のスピードと宿主の免疫応答の刺激のレベルのバランスの結果が致死となるか、そうでないかを決定すると考える。rHEP株は脳内では増殖できないが、強い免疫応答を誘導して、致死にはいたらない。しかしrHEP<sup>333R</sup>株は脳内で早く増殖し、免疫誘導が十分に引き起こされるまでに、ウイルスが多量に増殖し、マウスを死に至らしめると考える。

ウイルス中和抗体は中枢神経からウイルスを排除する最も重要な因子である。rHEP株の脳内接種により、ウイルスの増殖はみられないが、中和抗体の誘導は素早く起こる。一方、rHEP<sup>333R</sup>株の接種ではウイルスの増殖は早い、それに比べて中和抗体の誘導は遅い。この理由として、rHEP<sup>333R</sup>株の増殖、伝播はneuron-to-neuronによる伝播で、免疫誘導の刺激を与えることが少ないことが考えられる。また、rHEP株は増殖、伝播は起こさないが、アポトーシスを誘導することにより免疫応答の刺激が引き起こされると考える。一般に、病原性の低い株ほどアポトーシスを誘導しやすく、免疫誘導の反応が早く起こることが知られている。

## E. 結論

HEP-Flury株は表面糖蛋白質であるG蛋白質の333位のアミノ酸がグルタミンであり、最も病原性の弱い株として知られており、日本のヒト用ワクチンの製造株である。そのcDNA発現株であるrHEP株の333位のグルタミンをアルギニンに置換することによりrHEP<sup>333R</sup>株を作製した。このrHEP<sup>333R</sup>株は病原性が現れることが示された。遺伝子ベクターの安全性を考える上で重要な所見である。

## F. 健康危機管理情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Ito-Takayama, M., Inoue, K., Shoji, Y., Inoue, S., Iijima, T., Sakai, T., Kurane, I., Morimoto, K. A highly attenuated rabies virus HEP-Flury strain reverts to virulent by single amino acid substitution to arginine at position 333 in glycoprotein. *Virus Res.* 119: 208-215 (2006)

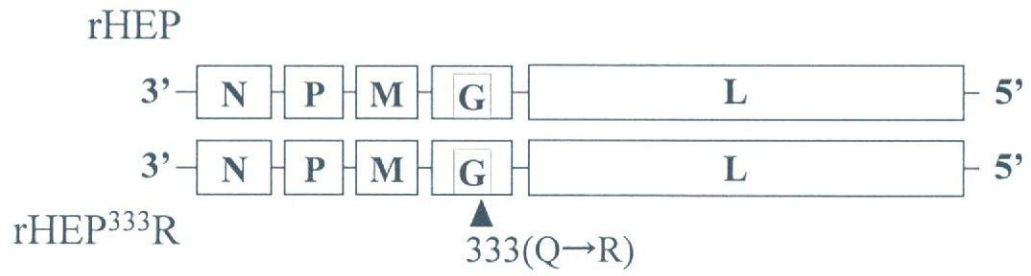
Khawplod, P., Shoji, Y., Ubol, S., Wilde, H., Mitmoonpitak, C., Nishizono, A., Kurane, I., Morimoto, K. Genetic analysis of dog rabies viruses circulating in Bangkok. *Infection, Genetics and Evolution* 6: 235-240 (2006)

2. 学会発表

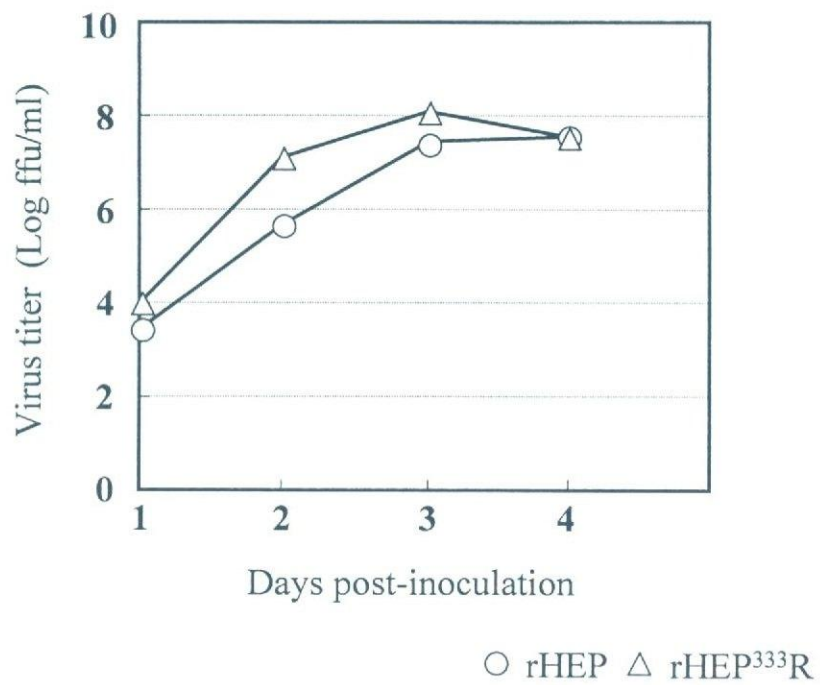
K. Morimoto. Rabies situations in the world – the virus structure, pathogenesis, diagnosis and control. 中国狂犬病防疫研究会 南京市 中国 May (2006)

K. Morimoto. Rabies detection. Academic conference on Rabies in 2006, Beijing, October 26, (2006)

H. 知的財産権の出願・登録状況  
なし



### Virus growth in NA cells



☒ 1

表1. In vitro neurotropism of rHEP and rHEP333R

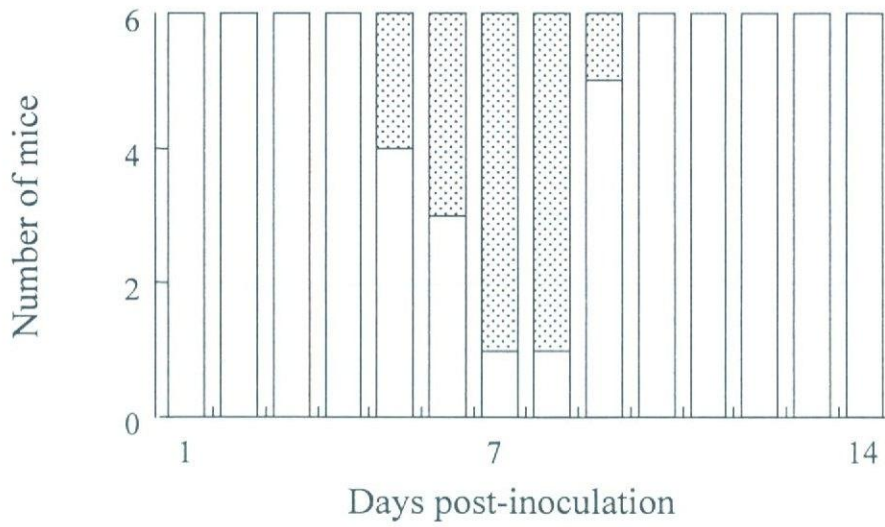
Strain	Titer, ffu/ml*		In vitro neurotropism index**
	NA	BHK	
rHEP	1.0x10 <sup>8</sup>	1.0x10 <sup>8</sup>	0.0
rHEP <sup>333R</sup>	3.5x10 <sup>8</sup>	1.1x10 <sup>7</sup>	1.5
LEP-Flury	1.0x10 <sup>7</sup>	2.0x10 <sup>5</sup>	1.7
CVS	1.5x10 <sup>8</sup>	4.5x10 <sup>6</sup>	1.5

\*Each virus was titrated in NA or BHK-21 cells.

\*\*The in vitro neurotropism index is expressed with the logarithm of the titer in NA cells minus the logarithm of the titer in BHK-21 cells.

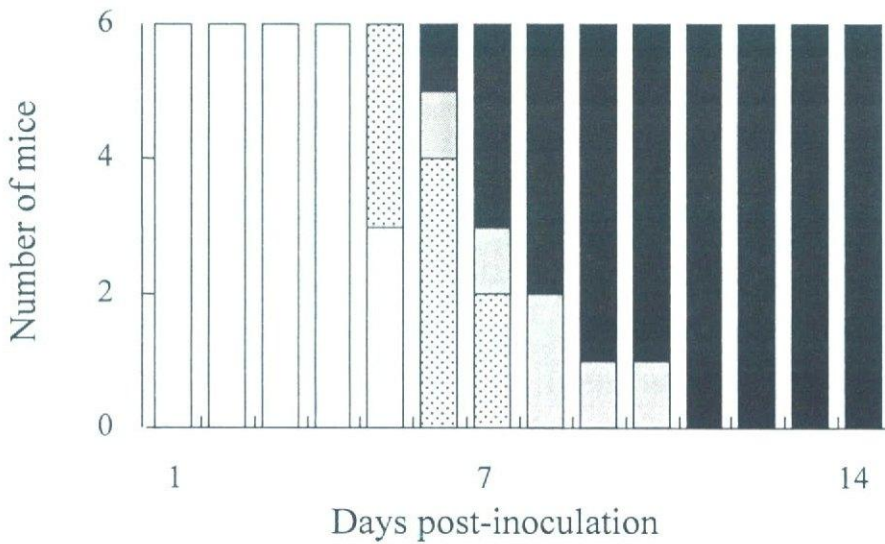


### rHEP



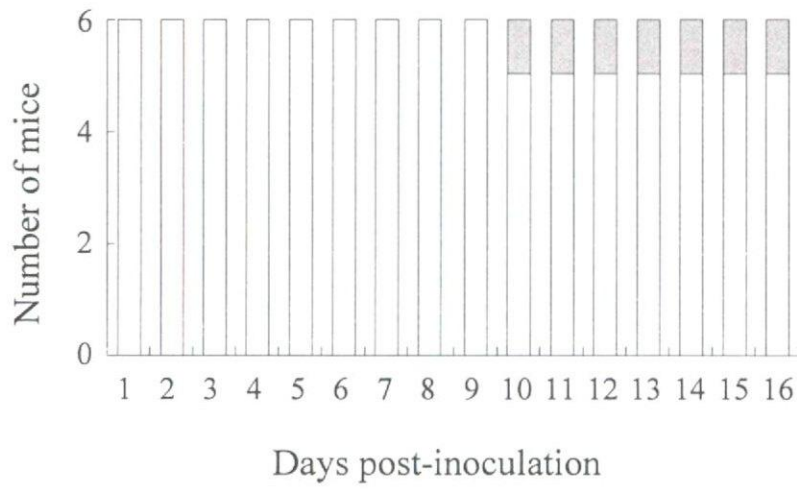
Normal
  Weight loss Ruffed fur
  Neurological symptoms
  Dead

### rHEP<sup>333R</sup>



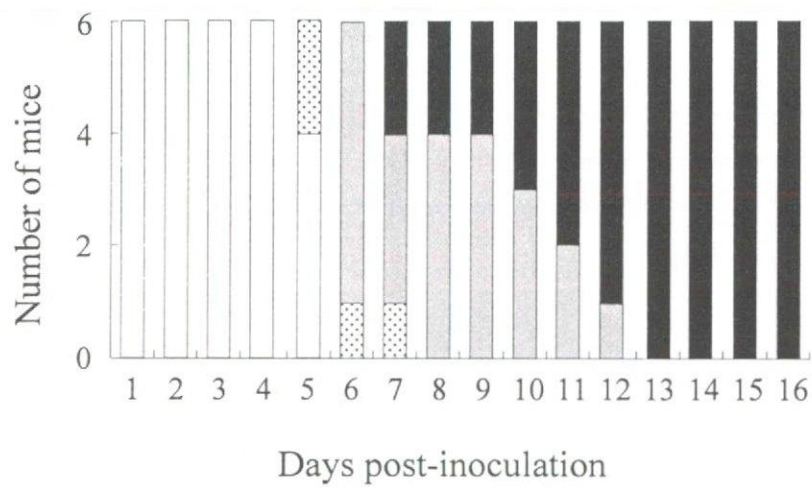
☒ 2

### rHEP<sup>333</sup>R



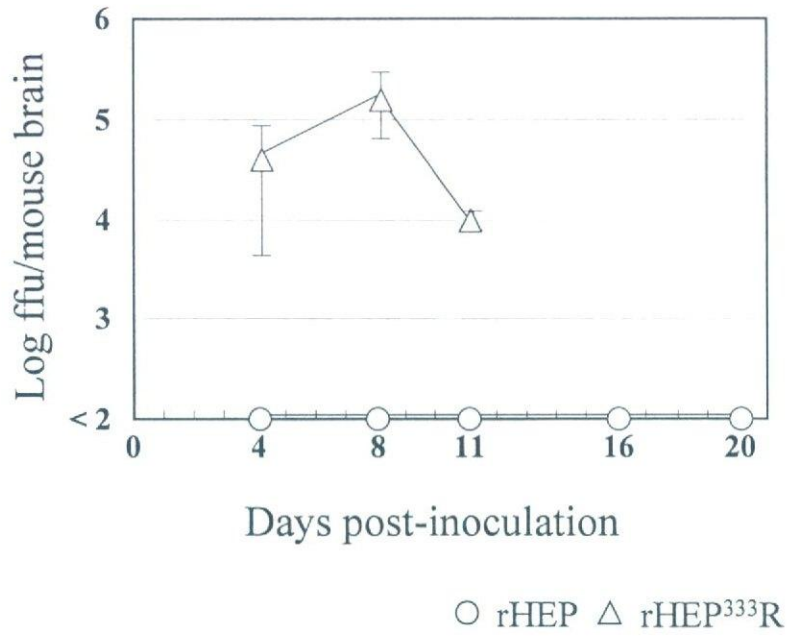
□ Normal    ▨ Weight loss Ruffed fur    ▩ Neurological symptoms    ■ Dead

### CVS



☒ 3

### Virus growth in brain



### Neutralizing antibody

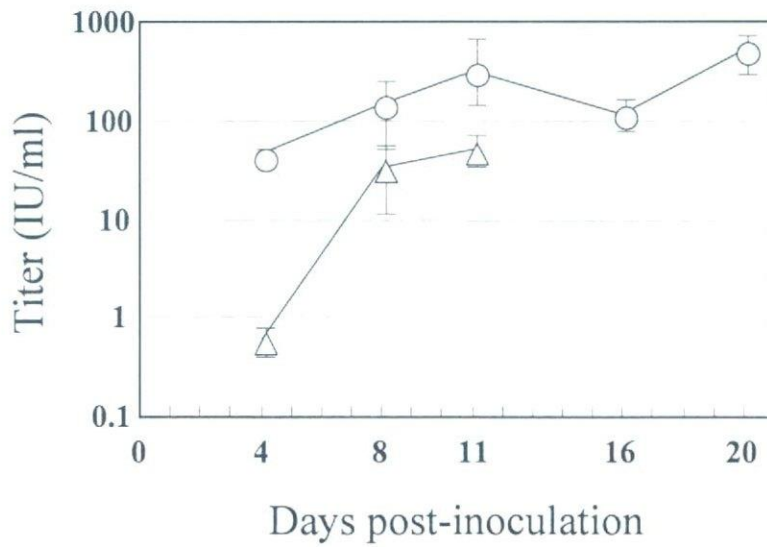
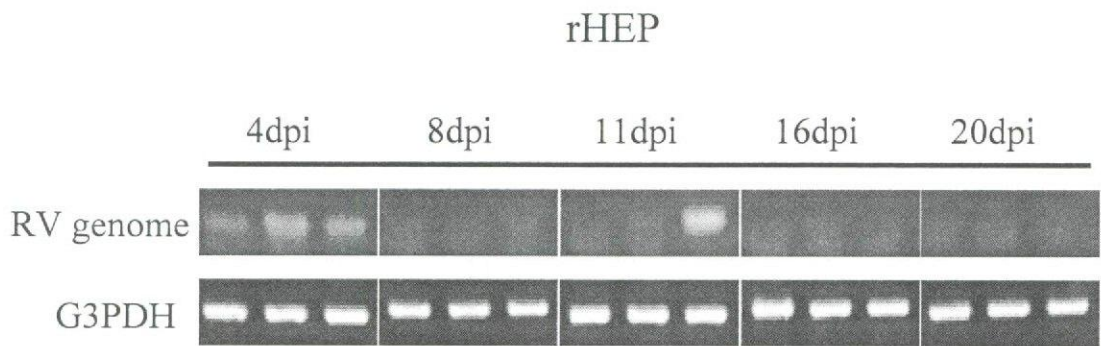


図 4





dpi (days post-inoculation)

☒ 5

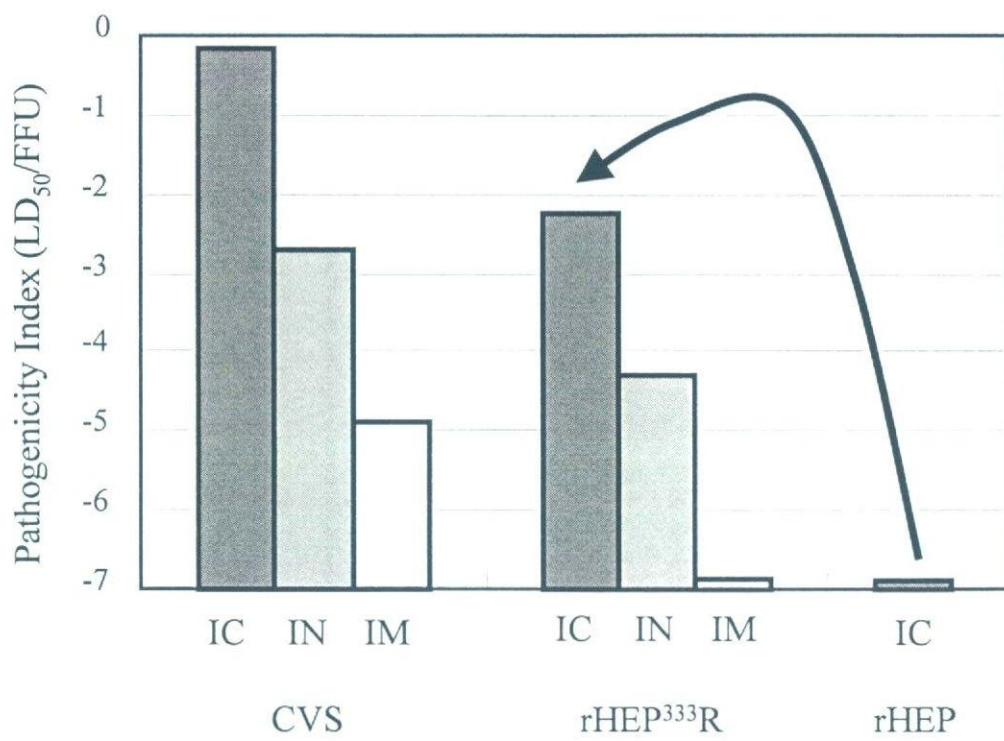


图 6

## フラビウイルス抗原を発現するリコンビナント狂犬病ウイルスの作製

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）  
伊藤睦代（国立感染症研究所 ウイルス第一部）

研究要旨：日本脳炎ウイルス、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ウイルスで日本脳炎ウイルス血清型群に属し、マレーバレー脳炎ウイルス、セントルイス脳炎ウイルスなどとその抗原性が極めて類似している。ところで狂犬病ウイルスのワクチン株である HEP-Flury 株の cDNA に外来遺伝子を導入することによって標的の培養細胞あるいは動物個体に外来蛋白質を発現させることが出来る。我々は狂犬ウイルスベクターを用いたワクチン開発のモデルとしてすでにワクチンの評価法が確立されている日本脳炎ウイルスおよび未だヒト用ワクチンのないウエストナイルウイルスのコア蛋白質および膜蛋白質を用いた。ウイルス力価  $1.0 \times 10^7$  PFU/ml の各ウイルスから RNA を抽出し、RT-PCR にて目的遺伝子であるコア蛋白質および膜蛋白質を増幅した。目的遺伝子を pcDNA3.1(+)を用いてクローニングし、蛋白質発現の確認を行ったところ、目的の蛋白質の発現を確認した。現在、目的遺伝子を狂犬病ウイルスベクター pHEP3.0 にサブクローニングし、リコンビナントウイルスの作製を試みている。

### A. 研究目的

日本脳炎ウイルスおよび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に属するエンベロープを有する直径 40-50nm の一本鎖 RNA ウイルスで、共に日本脳炎血清型群に分類される。フラビウイルスのゲノムには 5' 側より構造蛋白質のコア蛋白質 (C)、先駆膜蛋白質 (prM)、外被膜蛋白質 (E)、次いで非構造蛋白質 (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5) の遺伝子が順にコードされている。このうち中和抗体誘導に関わる蛋白質は prM, E, NS1 であり、CTL エピトープを含むと報告されている主な蛋白質は NS3 及び E である。

日本脳炎ウイルスは東アジアから東南アジア、南アジア地域に広く分布しており、イエカ属の蚊によって媒介される。感染者

の多くが無症状に終わるが本症を発症した場合突然の高熱に始まり重症例では脳神経麻痺などの神経症状を示す。死亡率は 20-40% で特に幼少児や高齢者で高く予後不良である。日本では現在も日本脳炎ウイルスの感染環がブタと蚊の間で維持されておりヒトへの感染の危険性は依然として存在するため今後も日本脳炎に対する予防等の対策が必要である。

ウエストナイルウイルスは 1937 年にウガンダのウエストナイル地区で発熱した女性から初めて分離されたウイルスで、アフリカ、中東、ヨーロッパ、アメリカ、中央アジア諸国に広く分布しており、蚊によって媒介される。ウエストナイルウイルスのヒトにおける潜伏期間は 2-15 日で、多くは不顕性感染 (70~80%) に終わるが、ウエスト



ナイル熱を発症した場合には発熱，頭痛，背部痛，筋肉痛，食欲不振，眩暈感，倦怠感などの症状が 3-6 日間続き，発疹，リンパ節腫脹も認められる．さらに重篤な症状として，感染者の約 150 人に 1 人が髄膜炎や脳炎を発症し，激しい頭痛，高熱，呼吸困難，方向感覚の欠如，小脳性運動失調，意識低下，眼痛，昏睡，震顫等の症状を呈する．このような重症患者は高齢者に多く，髄膜炎を起こした患者の致命率は 3-15% とされる．また 2005 年には本邦で初めて輸入症例が報告され今後警戒が必要である．

狂犬病ウイルスは，ラブドウイルス科リッサウイルス属の一本鎖(-)RNA ウイルスである．狂犬ウイルスベクターの特徴は 1) RNA ウイルスである狂犬ウイルスは細胞質で増殖するのでリコンビネーション，リバーション，インテグレーションが観察されず，2) 大きな外来遺伝子を安定して導入可能で，3) 感染細胞に細胞変性を起こさず外来遺伝子を長期に渡り大量発現すること等が挙げられる．そこでわれわれは組換え狂犬ウイルスを用いたワクチン開発を試みそのモデルとして，すでに不活化ワクチンが普及しマウスモデルが確立されている日本脳炎ウイルスおよび未だヒト用ワクチンがないウエストナイルウイルスを選択した．その結果われわれは日本脳炎ウイルスおよびウエストナイルウイルスから RNA を抽出し，RT-PCR にて目的遺伝子である C 蛋白質，C 蛋白質から E 蛋白質，prM 蛋白質から E 蛋白質の各領域をクローニングしその発現を確認した．また，各目的遺伝子をそれぞれ狂犬ウイルスベクターに導入した．

## B. 研究方法

ウイルスと培養細胞：日本脳炎ウイルスの cDNA 作製にあたってはワクチン株である中山株を用いた．ウエストナイルウイルスの cDNA 作製にあたっては米国ニューヨーク州で分離された NY 株を用いた．培養細胞はサル腎由来 Vero 細胞，ハムスター腎臓由来 BHK-21 細胞，マウス神経芽種細胞より樹立された NA 細胞をそれぞれ MEM，DMEM (SIGMA) に 10% の牛胎児血清を加えた培地にて維持した．

ウイルス力価測定：日本脳炎ウイルスおよび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  $4 \times 10^5$  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  $\mu$ 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，6 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．

RT-PCR：ウイルス培養上清から High Pure Viral RNA kit (ロシュ) を用いてウイルス RNA を抽出した．次いでランダムプライマー (インビトロジェン) を用いて逆転写酵素 SuperScript III (インビトロジェン) により日本脳炎ウイルスの cDNA を作製した．作製した cDNA を鋳型として PCR 反応を行い，目的遺伝子を増幅した．PCR 産物を 1.5% アガロースゲルを用いて電気泳動し，エチジウムブロマイドで染色し確認した．

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．

遺伝子導入：10cm デッシュに  $5 \times 10^6$  の Vero 細胞，Cos-7 細胞をそれぞれ播種し，3  $\mu$ g の日本脳炎ウイルスの C 蛋白質 (380bp)，C 蛋白質から E 蛋白質 (2381bp) ウエストナイル

ウイルスのC蛋白質 (380bp) , prM蛋白質からE蛋白質 (2000bp) の各目的遺伝子をクローニングした pcDNA3.1 プラスミドを Lipofectoamin 2000 (Invitrogen) を用いて導入した。導入2日後にこれを観察し実験に用いた。

**蛍光抗体法:** 目的蛋白質の発現確認を蛍光抗体法を用いて行った。蛍光染色は一次抗体として抗日本脳炎ウサギ抗体および抗ウエストナイルウサギ抗体をそれぞれ用い、二次抗体としてFITCラベル抗ウサギ-ヤギ抗体を用いた。抗原抗体反応はそれぞれ37°C30分行い、蛍光顕微鏡下で観察した。

**リコンビナント狂犬病ウイルスの作製:** 日本脳炎ウイルス、ウエストナイルウイルスの各目的蛋白質を組み込んだ狂犬病ウイルスゲノム完全長cDNAプラスミド (pHEP3.0) と狂犬病ウイルスの各N, P, Lの遺伝子cDNAをもつプラスミド(それぞれpH-N, pH-P, pH-L)を培養細胞BHK-21に同時にトランスフェクトし、4日間培養後その培養上清を回収後NA細胞に接種した。その後さらに4日間培養しその培養上清を回収し目的ウイルス液とした。(図1)

### C. 研究結果

**目的遺伝子のクローニング:** 各ウイルスのRNA抽出を日本脳炎ウイルス、ウエストナイルウイルスの各ウイルス液より行い、得られた産物を鋳型としてRT-PCRにより日本脳炎ウイルスのC蛋白質 (380bp) , C蛋白質からE蛋白質 (2381bp) ウエストナイルウイルスのC蛋白質 (380bp) , prM蛋白質からE蛋白質 (2000bp) の各目的遺伝子を得ることが出来た。得られた遺伝子をクローニングベクターpcDNA3.1にクローニングした。

**目的遺伝子の発現確認:** クローニングベクターpcDNA3.1にクローニングした各遺伝子をBHK細胞にリポフェクション法で導入し、各蛋白質の発現を蛍光抗体法にて確認した。その結果各蛋白質の発現が確認された。このことから目的遺伝子は目的蛋白質をコードしていることが示唆された。

**目的遺伝子の狂犬ウイルスベクターへの導入:** 得られた目的遺伝子を狂犬ウイルスベクターの制限酵素 *BsiWI* 部位に導入し、日本脳炎ウイルス蛋白質組換え狂犬ウイルスおよびウエストナイルウイルス蛋白質組換え狂犬ウイルスの作製を現在試みている。

### D. 考察

本研究の目的は狂犬ウイルスベクターを応用した安価で迅速なワクチン開発のモデルとしてすでに不活化ワクチンが開発されている日本脳炎ウイルス抗原および現在も米国で猛威を振るっているウエストナイルウイルス抗原を発現する組換え狂犬ウイルスを作製することである。目的遺伝子をクローニングベクターpcDNA3.1にクローニングし、哺乳動物培養細胞における発現を検討した結果日本脳炎ウイルスおよびウエストナイルウイルスのC蛋白質、膜蛋白質の各領域の遺伝子発現が確認されたため目的遺伝子は目的蛋白質をコードしていることが示唆された。次に目的遺伝子を狂犬病ウイルスベクターにサブクローニングし、リコンビナントウイルスの作製を試みた。現在のところ目的リコンビナントウイルスは得られていないが、これは(-)RNAウイルスである狂犬病ウイルスプラスミドに(+)RNAウイルスであるフラビウイルスの遺伝子を組み込んだことにより何らかの阻害作用が働いている可能



性が考えられる。現在さらなる条件検討を行いリコンビナントウイルスの作製に取り組んでいる。

フラビウイルス組換え狂犬ウイルスワクチンを開発するにあたり、我々は日本脳炎不活化ワクチンに含まれるC蛋白質からE蛋白質までのフラビウイルス遺伝子の各領域を選択した。各抗原を発現する組換え狂犬ウイルスと日本脳炎不活化ワクチンを比較することにより各抗原の抗原性、安全性等の検討が可能となり、より有効なワクチンの開発につながる。今後マウスモデルを用いて抗原性及び安全性を明らかにしていくことにより外来抗原発現組換え狂犬ウイルスを用いたワクチン開発モデルを確立する。

#### E. 結論

狂犬ウイルスベクターを用いたワクチン開発において、すでに有効なワクチンが広く臨床応用されている日本脳炎ウイルスは有用なモデルである。またウエストナイルウイルスは現在も米国で猛威を振るっており、ヒト用ワクチンの開発が望まれている。狂犬ウイルスベクターは目的遺伝子の導入効率が得られやすく、リコンビネーション、リバージョン、インテグレーションが観察されず、比較的大きな外来遺伝子を安定して導入可能である等の利点がある。組換え狂犬ウイルスを作製し、マウスモデルを用いた抗原性及び安全性を明らかにしていくことは狂犬ウイルスベクターを用いたワクチン開発において有用なデータとなることが期待される。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文

Hamano, M., Lim, C.K., Takagi, H., Sawabe, K., Kuwayama, M., Kishi, N., Kurane, I., Takasaki, T. Detection of antibodies to Japanese encephalitis virus in the wild boars in Hiroshima prefecture, Japan. *Epidemiology and Infection* 12, 1-4, 2007

Mizutani, T., Endoh, D., Okamoto, M., Shirato, K., Shimizu, H., Arita, M., Fukushima, S., Saijo, M., Sakai, K., Lim, C.K., Ito, M., Nerome, R., Takasaki, T., Ishii, K., Suzuki, T., Kurane, I., Morikawa, S., Nishimura, H. A new system for rapid genome sequencing of emerging RNA viruses. *Emerging Infectious Diseases* (in press, 2007)

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 ウエストナイル熱・脳炎の流行状況 臨床と微生物 33(4): 393-398, 2006

林 昌宏, 倉根一郎 ウエストナイル熱・脳炎 *Pharma Medica* 24(8): 15-20, 2006

##### 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

クワクチンの混合投与による中和抗体の誘導 第54回日本ウイルス学会 2006年11月

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年3月18-20日

原田文植, 高崎智彦, 高木弘隆, 林 昌宏, 伊藤美佳子, 倉根一郎 日本人デング熱患者における抗ウエストナイルウイルス交差中和抗体に関する検討 第80回日本感染症学会 2006年4月

高崎智彦, 小滝 徹, 根路銘令子, 林 昌宏, 伊藤美佳子, 田島 茂, 倉根一郎 本邦原因不明脳炎・無菌性髄膜炎における日本脳炎ウイルス関与に関する回顧的調査 第41回日本脳炎ウイルス生態学研究会 2006年5月

林 昌宏, 高崎 智彦, 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 日本脳炎ウイルス中和抗体保有マウスのウエストナイル不活化ワクチンによる免疫応答の検討 第54回日本ウイルス学会 2006年11月

井本淳一, 石川知弘, 村上賢二, 林 昌宏, 濱野正敬, 高崎智彦, 倉根一郎, 小西英二 ブタにおける日本脳炎DNAワクチンおよびタンパ

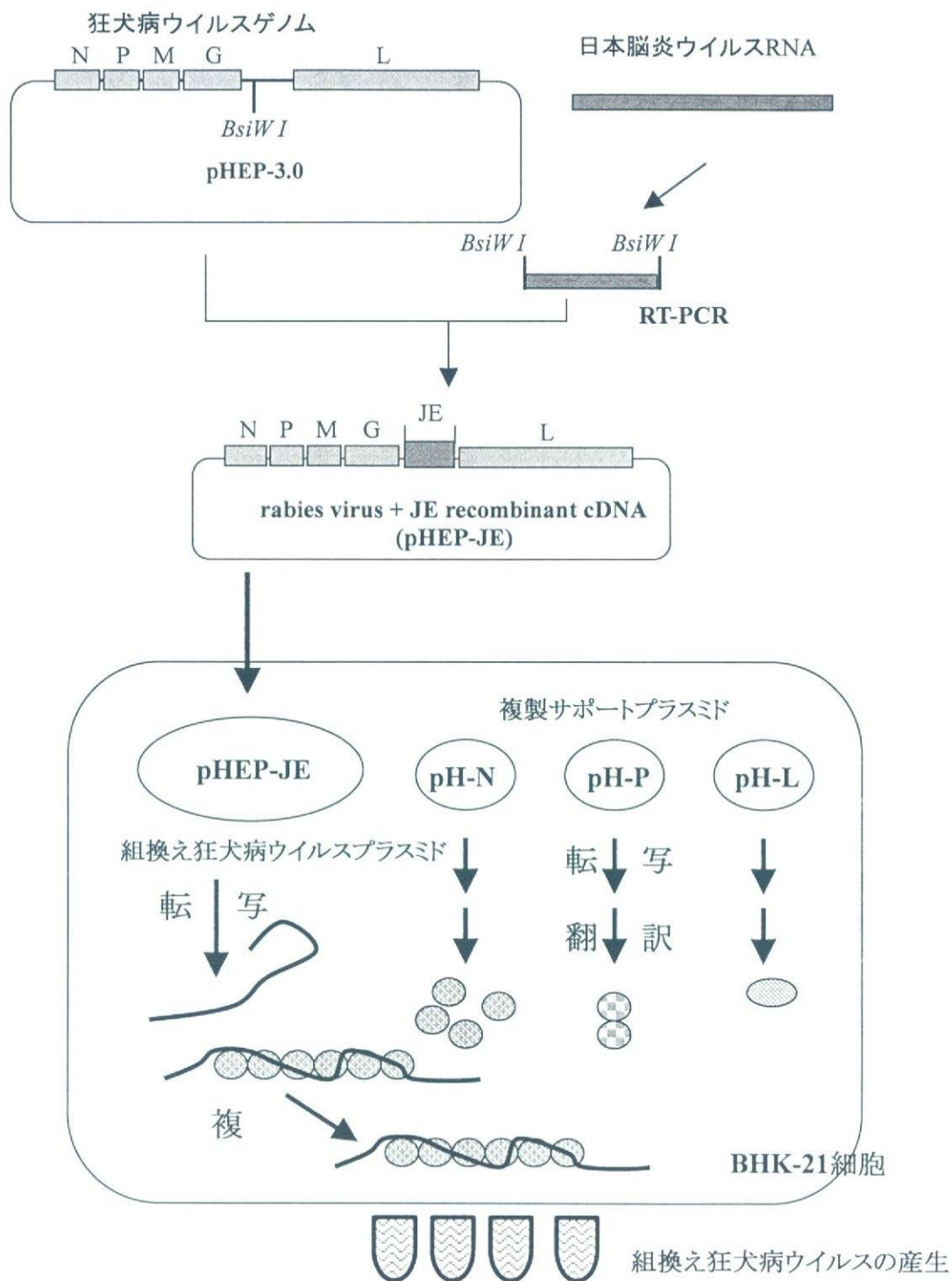


図 1. JE 組換え狂犬病ウイルス cDNA プラスミド構築の手順

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狂犬病ウイルスの cDNA プラスミド pHEP に導入した(pHEP-JE). pHEP-JE はペルパープラスミド pH-N, pH-P, pH-L と共に BHK21 細胞に導入し, リコンビナントウイルスの作製を試みた.

## センダイウイルスベクターの開発および応用に関する研究

分担研究者：加藤 篤（国立感染症研究所 ウイルス第三部）

研究要旨：センダイウイルスは、ほ乳類細胞や鳥類細胞で旺盛に増殖するため、センダイウイルスをベクターとした場合にも、多くの細胞で大量発現を期待できる。ウイルスゲノムの転写と複製が細胞の転写複製酵素に依存せず、ウイルス独自の転写、複製酵素で行われるというウイルスの特性がこの事に大きく寄与している。センダイウイルスの特性を生かしたベクターを開発するには、ウイルス遺伝子の転写に必要な遺伝子(N、P、L)以外をウイルスゲノムから無くすることが安全上並びに外来遺伝子挿入上も有利である。ベクターに残った N、P、L 遺伝子の機能解析は、ベクターの特性を知るためにも重要である。中でも P 遺伝子からは P 蛋白質以外に V 蛋白質、C 蛋白質が産生され、これらの蛋白質がベクター化時に如何なる影響を与えるかを知る必要がある。近年、C 蛋白質に宿主細胞がインターフェロンにより抗ウイルス状態になる事を妨げる機能がある事が判明し、その機能を除いたベクターが実的に作成可能か否かを検討した。C 蛋白質に変異を加えてインターフェロン対抗能力を失ったセンダイウイルスを作製し、細胞に感染させたところ、親株センダイウイルスに比べて発現量が 1/10～1/20 になるものの発現可能であることが示された。ところが、この変異ウイルスをマウスに感染させると肺内で増殖すること無く排除されてしまい、まったく病原性を失っていた。抗インターフェロン機能を無くしたセンダイウイルスベクターは、培養細胞レベルでは使用可能であり、もし環境中に漏洩した場合にも無害であり、安全上有効であると思われた。

### A. 研究目的

センダイウイルス(SeV)は、パラミクソウイルス科のレスピロウイルス属のウイルスである。マウス等のげっ歯類に感染し、肺炎を起こすことで知られるウイルスである。パラミクソウイルスは、マイナス鎖の 1 本鎖 RNA をゲノムとして持ち、N、P、M、F、HN(H あるいは G とも呼ばれる)、L の 6 遺伝子を基本的に持つ。N、P、L 遺伝子が転写複製に関わっており、他は細胞への接着、侵入、粒子形成、出芽に関わる遺伝子である。

1996 年に SeV の cDNA からウイルスを生成する技術が確立し、ウイルス独自の転写の制御配列を使って外来遺伝子を発現させることが可能になっている(図 1)。ウイルスゲノムの転写複製に宿主の転写複製酵素を利用しないため、宿主細胞の細胞分裂速度、あるいは細胞周期の影響を受けにくい利点を持つ。また、細胞質でのみ増殖し、宿主細胞の核を利用する期間が無いため、宿主染色体に組込まれたり、損傷を与える等の危険性がない。一方、

自然界の RNA ウイルスの中にはウイルスゲノム間の交差複製が見られ、容易に組換え体が発現するものがある。しかし、パラミクソウイルスには、交差複製は認められず予期せぬ組換え体の出現を心配する必要が無い。

外来遺伝子発現機能は、最低限転写複製に必要な N、P、L 遺伝子以外の遺伝子を削り、細胞内で遺伝子発現とゲノム増殖だけをするレプリコンを作ることによって維持できる(図 1)。レプリコンは細胞内に留まって複製と転写を続けるのでレプリコンに挿入した外来遺伝子もまた、細胞内で長期間の発現を期待することができる。また、細胞分裂によっても早々に消え去ることはない。

N、P、L 遺伝子については、未だ不明な点が多くベクターとしての安全性を向上させるためには、これら遺伝子の機能を解析する必要がある。なかでも P 遺伝子からは、P 蛋白質の他に、C 蛋白質、V 蛋白質が産生され、これらの蛋白質の必要性及び役割についての解析が必要になっている。このうち V 蛋白質に