

Philippe M, Georges AJ, <u>Kurane I</u> , Morikawa S.	using monoclonal antibodies to recombinant 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		2007 (in press)

## パラミクソウイルスベクターの開発及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）  
協力研究者：竹田 誠（九州大学大学院 医学研究院 ウイルス学）  
協力研究者：山口良二（宮崎大学 農学部 獣医学科 家畜病理学講座）

研究要旨：パラミクソウイルスは、マイナス鎖の 1 本鎖 RNA をゲノムとして持つウイルスである。ウイルスゲノムの転写複製に宿主細胞の転写複製酵素を利用しないため、宿主の細胞分裂速度、あるいは細胞周期の影響を受けにくい特性を持ち、パラミクソウイルスをベクター化してもこの利点が保持される。パラミクソウイルス科のセンダイウイルス、麻疹ウイルス、ジステンパーウイルスについて cDNA を作成し、ウイルスベクター開発をめざした。センダイウイルスと麻疹ウイルスでは外来遺伝子を発現できるようになり、ジステンパーウイルスは麻疹ウイルスで得た知見を基にウイルス回収系の作成を行った。その結果、センダイウイルスでは各種の発現系が作出でき、ベクターを構成する P 遺伝子の機能の一部が明らかになった。麻疹ウイルスでは高効率回収系の作出並びにそれを利用した弱毒化機構の解析、分節型ゲノムベクターの作成が可能になった。ジステンパーウイルスでは新しい遺伝子型の野外株を基にして新型ワクチンのデザインが可能になった。

### A. 研究目的

従来ウイルスはヒトや動植物に病気を起こす厄介者であった。しかし、ワクチニアウイルスベクターの発明によりウイルスをベクター(道具)として有効に利用する道が生まれた。その後、レトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、パルボウイルスベクター等様々なウイルスベクターが開発されている。それぞれのウイルスベクター間に絶対的優劣があるのではなく、用途に応じたオプションとしてそれぞれのウイルス生活環あるいは特徴に合わせた使い方が工夫されている。

パラミクソウイルス亜科、レスピロウイルス属に分類されるセンダイウイルス(Sendai virus: SeV)、モルビリウイルス属に属する麻疹ウイルス(measles virus: MeV)とイヌジステンパーウイルス(canine distemper virus: CDV)は、マイナス鎖の非分節型 RNA をゲノムとして持つウイルスである。SeV はげっ歯類に呼吸器疾患を起こすウイルスである。病原性の異なる様々な株が存在し、わずか 10 pfu/マウスの量で致死性の肺炎を起こす強毒株から非致死性の持続感染を起こす株までである伝染性の高い病原体で、実験動物業界で最も警戒すべきウイルスの一つとされている。MeV も伝染性の高い病原体で、小児に急性発疹性疾患を

引き起こす。発熱、呼吸器炎症並びに免疫不全を引き起こす致死性の高い病原体である。また、回復してもしばらくして麻疹後脳炎あるいは亜急性硬化性全脳症を起こす場合がある。CDV も伝染性の高い病原体で、イヌに急性又は亜急性の呼吸器、消化器、皮膚、神経系疾患を引き起こす。

SeV は、宿主域が広く鶏細胞や様々な哺乳類由来細胞に感染し、増殖する事ができる。一時期、SeV の広範囲の細胞に接着できる能力とすぐれた細胞融合能を利用して、細胞工学的に細胞質雑種形成(cybrid)の道具として使われたことがある。一方、MeV は基本的に特定の霊長類細胞にのみ感染して増殖し、他の細胞には感染しない。CDV は特定のイヌ細胞にのみ感染して増殖し、他の細胞には感染しない。広い宿主域を持つ SeV に対して狭い宿主域である MeV と CDV の違いは、ウイルスが利用する細胞表面上のウイルス受容体の違いによる。SeV は、細胞表面上に一般的に存在する多糖類のシアル酸を利用するが、MeV 及び CDV はそれぞれヒト及びイヌ固有の SLAM (signaling lymphocytic activation molecule、CD150)を利用する。本研究では、同じパラミクソウイルスに属する 3 つの特色あるウイルスを用いて、(1) 組換えパラミク

ソウイルスを合成するための効率のよい技術を開発すること、(2) パラミクソウイルスベクターの性質を規定する分子的基盤を明らかにすること、(3) 多数の外來性遺伝子を挿入することができるパラミクソウイルスベクターを開発すること、並びに、(4) パライミクソウイルス病原性評価系(パラミクソウイルスベクターの安全性評価系)の作出を目的に実験を行った。

## B. 研究方法

### SeV C 変異を持つウイルスの作製。

抗インターフェロン(Interferon, IFN)活性を失った Cm\* (K<sup>151</sup>A, E<sup>153</sup>K, R<sup>157</sup>L)を SeV の cDNA に導入したプラスミド pSeV/Cm\*を作製した。常法に従って、LLCMK2 細胞に T7 ポリメラーゼ発現ワクチニアウイルス(vTF7.3)を感染させ、次に pT7-N、-P、-L と pSeV/Cm\*をトランスフェクションし組換えウイルス、SeV/Cm\*、を作製した。得られたウイルスの変異部分については、P 遺伝子を RT-PCR により増幅し、その塩基配列により確認した。

変異ウイルスの抗 IFN 活性の有無は、次のように確認した。HeLa 細胞を 12 穴プレートに均一になるように準備し、そのままあるいは、親株 SeV または変異 SeV/Cm\*を感染させて 4 時間後にヒト IFN-β を 0、10<sup>1</sup>、10<sup>2</sup>、10<sup>3</sup> IU/ml で 12 時間処理する。その後、水疱性口内炎ウイルス(VSV)を細胞あたりの感染価 5 で重感染させ、VSV が HeLa 細胞で増殖するか否かを 24 時間後に細胞内の VSV 蛋白質発現量により判定した。

### IFN 対抗能を失った SeV の細胞での増殖性

直径 5 cm のプレートに均一になるように 2fTGH 細胞と U3A 細胞(STAT1 が欠損した 2fTGH 細胞由来の細胞株)を増殖させ、細胞あたりの感染価 5 で親株 SeV または変異 SeV/Cm\*を感染させて細胞内ウイルス蛋白質を抗 SeV 抗体による免疫プロットで、細胞上清のウイルス量を CIU アッセイで測定した。

### IFN 対抗能を失った SeV のマウスでの病原性

5 週齢の 129S6 マウス(002045-M, Taconic Farms Inc.)を購入して実験に使った。麻酔下で 10<sup>7</sup>/25 μl の親株 SeV または変異 SeV/Cm\*を経鼻的に感染させた。毎日マウスを観察して体重を測定し、症状が現われたマウスは重篤化する前に安楽殺した。肺の病変は、肉眼的に肺の 1/4 がピンク色から赤に変わっていた場合には「1」、2/4 の場合には「2」、3/4 の場合

には「3」、4/4(全域)の場合の場合には「4」と記録した。肺内のウイルス量を測定するには、採取した肺を冷やした 1ml の DMEM と共にガラスホモジナイザーで壊し、1500xg で 20 分間遠心した上清をウイルス力価測定に用いた。

### インフルエンザウイルス HA(H5)発現 SeV ベクターの作成

ヒトへの広範囲な流行が心配される A 型インフルエンザウイルス(H5N1)の赤血球凝集素(HA)を A/turkey/Ireland/1378/85 (H5N8)から RT-PCR 法によりクローニングし、組換えセリダイウイルス (SeV/tukH5)を作成した。

組換え体を培養細胞に感染させ、間接蛍光抗体法並びにイムノプロット法を用いてインフルエンザウイルス HA 蛋白質を産生していることを確認した。強毒 H5 型インフルエンザウイルスの性質として、HA 蛋白質(HA0)がトリプシン非存在下でも HA1 と HA2 蛋白質に開裂する。組み換えセリダイウイルス発現 HA 蛋白質でもその性質が維持されているかをイムノプロット法にて確認した。

### 高効率組換え MeV 合成系の開発

ワクチニアウイルスが、CHO 細胞内では中期遺伝子の翻訳ができず、後期遺伝子蛋白質を発現できないという特性に着目し、T7RNA ポリメラーゼを初期遺伝子用のプロモーター下に組み込んだ組換えワクチニアウイルス vTF7-3 を用いた新たな系の開発を行った。用いるワクチニアウイルスウイルスを WR 株というヒトへの病原性の有無が明確ではない株を親株とした vTF7-3 から、天然痘撲滅の際に実際に利用された安全性の高い Lister 株を親株とした LO-T7-1 株に置き換えた系の開発を行った。

ワクチニアウイルスは、CHO 細胞内では増殖しないにもかかわらず、依然として CHO 細胞に中等度の細胞傷害を起こし、数日後にはアポトーシスによって死滅する。そこで、カスパーゼ阻害剤を利用して、細胞死を抑制することにより MeV 合成効率の向上を試みた。一方、VV5-4 細胞は、非増殖性の組換えレトロウイルスによりある特定の遺伝子がノックアウトされた変異 CHO 細胞である。ワクチニアウイルスは、VV5-4 細胞内では、ゲノム複製も中期遺伝子の転写も行うことができず、初期遺伝子の翻訳までしかできない。VV5-4 細胞を用いることにより、MeV の合成効率がさらに高まると考え、VV5-4 細胞を用いた系の開発を行った。

## MeV ワクチン株と野外株のキメラウイルス作成

高効率 MeV 合成系用いて MeV 生ワクチン関連株エドモントン株と病原性野生株とのキメラウイルスを約 20 種類作成した。作製したウイルスをさまざまな培養細胞へ感染させ、その増殖能を解析することにより、生ワクチン株が様々な培養細胞で増殖できるという性質を規定している遺伝子領域を調べた。

MeV H 遺伝子、M 遺伝子については、点変異を導入した多数の変異ウイルスを作製し、ワクチン株の性質を規定するアミノ酸変異の同定を試みた。さらに、それらの変異が H 蛋白質や M 蛋白質の機能にどのような変化をもたらし、ひいてはウイルスの増殖性をどのように変化させているのかについて解析を行った。

ワクチン株と野生株との間には、多くの塩基置換がみられるが、中でも P、V、C 蛋白質をコードしている P 遺伝子、そして、M と F 遺伝子に存在する各々約 500 と 700 塩基の蛋白質非翻訳領域に変異の集積がみられる。そこで、それらの遺伝子領域の機能を明らかにするために、蛋白質発現をノックアウトした変異ウイルス、あるいは、遺伝子領域を欠失させた変異ウイルスを作成し、それら変異ウイルスの性質の解析を行った。

## 多数外来遺伝子挿入型 MeV ウイルスベクターの作成

MeV のゲノムは非分節の長い一本鎖 RNA である。ウイルスゲノムへの多数の外来遺伝子の挿入や長い外来性遺伝子の挿入は、MeV の遺伝子発現機構の性質上、搭載できる遺伝子の数、ゲノム長には限界があり、困難が予想される。また、仮に挿入ができたとしても、ウイルスの増殖能が極端に低下してしまうことが予想され、ベクターとしての利用には不向きである可能性がある。そこで、MeV 粒子の多くが、複数本のゲノムを取り込む余地があるという性質に着目し、非分節の MeV ゲノムを複数本の短い分節に分けることにより、多数の外来性遺伝子や、長い外来性遺伝子を搭載できるのではないかと考え、2 分節、3 分節、そして 6 分節のゲノムをもつ MeV ベクターの作成を試みた。また、その各々に 4、6、12 箇所の転写ユニットを新たに追加し、それら転写ユニットの各々 2、5、6 箇所にレポーター遺伝子の挿入を行い、分節ゲノムウイルスの増殖能や外来性遺伝子の発現能について解析した。

## MeV の病原性並びに MeV ベクターの安全性確認のための小動物モデルの開発

MeV の自然界での感染宿主はヒトのみであり、実験的にもサル以外の動物には感染しない。霊長類以外の動物に感染できない主な理由は MeV が宿主細胞に感染する際に用いるウイルス受容体ヒト(h)SLAM の種特異性が高く、霊長類以外の動物の相同蛋白質が使えないからである。そこで hSLAM 分子を発現するノックインマウスを作成し、その遺伝子改変マウスの MeV への感受性について検討した。

## CDV 感染動物

生後 7 週目と 11 週目に Onderstepoort 株由来のデュラミン 8 (共立製薬株式会社 CDV ワクチン)を接種したイヌの中で、鼻汁目脂及び下痢症状を示す 3 ヶ月齢イヌ 3 匹(No.1、No.2、No.3)を解析に用いた。

## CDV 病理学的検索と免疫染色

剖検後、標本は 10%ホルマリン固定後パラフィン包埋した。4 μm で薄切し、ヘマトキシリン・エオジン染色を行った。免疫染色は抗-Nucleoprotein 単クローン抗体及びエンビジョンポリマー (Dako-Japan, Japan) を用いて常法に従って実施した。

## CDV 分離と力価測定

ウイルス分離と力価測定は、-80℃に保存しておいた剖検後の新鮮生材料 0.2 g を Dulbecco の modified Eagle's MEM にて乳剤を作成して、超音波破碎後遠心した上清について行った。ウイルス分離には 24 穴プレートに準備したイヌ (c)SLAM 発現 Vero 細胞 (Vero-DST: Vero cell expressing canine signalling lymphocyte activation molecules)を用いて行った。ウイルス力価測定には Vero-DST と 96 穴プレートを用いて 10 倍段階希釈で行い、TCID<sub>50</sub> で力価を算出した。

## RT-PCR による CDV 遺伝子の増幅と塩基配列決定

CDV 感染 Vero-DST 細胞から Trizol (インビトロジェン) を用いて RNA を抽出後、One-Step PCR kit (AMV) (TAKARA)を用いて P 遺伝子と H 遺伝子について RT-PCR を行った。それぞれの PCR 産物は 429bp と 2100bp で PCR 精製後、Big Dye Terminator v3.1 キット (Applied Biosystems)を用いて塩基配列の決定を行った。得られた塩基配列は Clustal W プログラム (DDBJ)を利用して解析した。系統樹

は neighbor-joining 法を使用した Phylip 95 ソフトウェアパッケージを使用して作成した。

#### CDVcDNA に利用したプラスミッド

MeV は Dr. Billeter から、BSR T7/5 細胞は Dr. Conzelmann から分与されたものを使った。MeV のミニゲノムシステムの pBTKII+ をベースとする pMV(+)-323 と pEMC-Pa 及び pEMC-La を用いた。

### C. 研究結果

#### (1) 抗 IFN 能の無い SeV の作製。

Cm\* (K<sup>151</sup>A, E<sup>153</sup>K, R<sup>157</sup>L)変異を持つ SeV を作製した。CV1 細胞で親株 SeV と変異 SeV/Cm\* にブラックを作らせると、親株 SeV のブラックに比べて SeV/Cm\* のブラックは縁辺部の明瞭性に乏しいブラックを形成した(図 1)。

作製した SeV/Cm\* が確かに抗 IFN 能を失っているか否かを確認するために HeLa 細胞に SeV 感染させ、その後に IFN を作用させてその IFN の効果が先に接種されていた SeV により無効化されたか否かを、最後に重感染させる VSV が増殖できるか否かで評価した(図 2)。SeV 感染(mock)の細胞に IFN を 0-10<sup>3</sup> IU/ml で処理すると、0 または 10<sup>1</sup> IU/ml では細胞内で VSV が増え、VSV 蛋白質の産生が細胞内に認められる。しかし、10<sup>2</sup> IU/ml では VSV 蛋白質の量が少なくなり、10<sup>3</sup> IU/ml ではほとんど何も見えなくなり、IFN の抗ウイルス効果を観察することができる。同じ条件下で、IFN よりも先に親株 SeV を感染させておくと、IFN を 10<sup>3</sup> IU/ml で処理しても VSV 蛋白質は認められ、IFN の抗ウイルス効果が SeV により発揮されない。SeV/Cm\* を予め感染させた HeLa 細胞には IFN 処理を行い、VSV 重感染させたところ、濃度に関係なくすべての実験群で VSV 蛋白質が認められず、SeV/Cm\* を感染させただけで IFN が産生され、細胞が抗ウイルス状態になった(図 2)。このことから、C に変異を加えた SeV/Cm\* は、IFN 抵抗能力を失った株であることが確認された。

#### (2) IFN 対抗能を失った SeV の培養細胞での増殖性とウイルス蛋白質発現。

外来遺伝子を長期に発現させる安全な SeV レプリコンには最低限 N、P、L 遺伝子があればよい。P 遺伝子に同じくコードされる C 蛋白質の抗 IFN 能は、ウイルスによる蛋白質発現にとってどれほどの意味を持つのかを評価する目的で、2fTGH 細胞に、感染価 5 で親株 SeV と変異 SeV/Cm\* を感染させ、細胞内ウイ

ルス蛋白質量を比較した(図 3)。どちらの感染細胞も感染後 6 時間目ではウイルス蛋白質の発現は検出限界以下であるが、12 時間目から検出されようになった。このときに、親株と変異ウイルスの間で大きな違いはなかった。親株ではそれ以降 12 時間目以降、蛋白質発現量が 24 時間目まで徐々に増加するのに対して、変異ウイルスは 12 時間目のレベルからやや親株に比べて低い傾向を示した。抗 IFN 能を持たないからといって極端に遺伝子発現が低下したわけではなかった。

細胞の培養上清中のウイルス量を測定すると親株と変異ウイルスはどちらも感染後 24 時間目に最大値を示し、36 時間目には減少した。変異 SeV/Cm\* は増殖速度が単純に遅いのではなく、増殖の経過は親株と同等だが最大量が少ないことがわかった。24 時間目と 36 時間目の培養上清中のウイルスの差はおおよそ 1/10-1/20 であった(図 3)。

#### (3) IFN 対抗能を失った SeV のマウスでの病原性

個体での評価を行うために親株 SeV と変異 SeV Cm\* をマウスに経鼻感染させた(図 4)。親株 SeV は接種後 1 日目から高いウイルス価を示し、それが維持されていた。マウスの肺病変は、感染後 5 日目には肉眼的に肺の半分を超える病原度 3 に達し、7 日目には症状の程度から安楽殺を行い、肺を観察したところ肺全体にわたる病変(病変度数 4)が認められた。ところが一方、変異 SeV Cm\* は観察期間中まったく肉眼的な肺病変が認められなかった(病変度数 0)。接種したウイルスは肺でほとんど増える事がなく低下を続け、接種後 3 日目以降は検出限界以下になった。変異 SeV Cm\* は、マウスで増殖性を失い、まったく病原性が無いウイルスであった(図 4)。

#### (4) 外来遺伝子 H5 インフルエンザウイルスの HA を挿入 SeV の作成

H5 型のインフルエンザウイルスの HA 遺伝子を SeV の再上流の位置に発現ユニットとともに組込んだ組換え SeV (SeV/tukH5) を作成した(図 5)。SeV/tukH5 の培養細胞レベルでの増殖性は、親株 SeV と比べてそれほど大きな遜色はなかった。SeV/tukH5 感染細胞は、インフルエンザウイルスに対する抗体で陽性に染まり、HA 蛋白質を産生していることが推定された。

#### (5) H5 HA 発現 SeV ベクター

SeV/tukH5 感染細胞の溶解液を SDS ポリア

クリルアミドゲル電気泳動に供し、インフルエンザウイルスに対する抗体でイムノプロットを行い発現蛋白質のサイズを確認したところ、SeV/tukH5 の産生する HA 分子は、培養細胞ではトリプシン非存在下にもかかわらず HA1 と HA2 に開裂していた(図 6 左)。一方、SeV/tukH5 粒子を培養上清から精製したところ、ウイルス粒子中にもインフルエンザウイルス HA 蛋白質が取り込まれていることが認められた。そこで、精製ウイルス粒子をインフルエンザウイルスに対する抗体で処理したのち、金コロイド粒子標識二次抗体を作用させたところ、親株 SeV では電子顕微鏡的に金コロイド粒子が観察されないのに対して、SeV/tukH5 では金コロイド粒子が、ウイルス表面に観察された(図 6 右)。

#### (6) 高効率組換え MeV 合成系の開発

VV5-4 細胞、組換えワクチニアウイルス vTF7-3、カスパーゼ阻害剤を利用することにより、3.5cm 径の培養皿に撒いた約  $10^6$  細胞のうち、300 から 1000 個の細胞が、導入された cDNA から感染性の MeV の合成を開始できるようになり、従来系と比べて約 1000 倍効率よく MeV を合成できる系が開発できた。

安全性の面を配慮して、ワクチニアウイルス vTF7-3 の代わりに LO-T7-1 を用いた系を開発した。LO-T7-1 を利用する場合には、VV5-4 細胞を用いるよりも、通常の CHO 細胞(この場合、MeV の受容体 hSLAM を発現した CHO/hSLAM を利用する)を用いる方が効率が良いことが分かった。この場合、VV5-4 細胞と vTF7-3 を用いた系と比べると数倍効率が低下するものの、依然としてウイルス回収は支障の無いレベルであった。

#### (7) MeV ワクチン株の性質を規定する分子的基盤の解析

MeV 野生株は、限られた免疫系の細胞でしか増殖できない。その主な理由のひとつは、野生株の受容体である hSLAM の発現がそれらの細胞に限られているからである。一方、MeV ワクチン株は、ヒトやサルほとんど全ての細胞株あるいはニワトリ胚細胞で効率よく増殖できる。そのようなワクチン株の広い細胞指向性は、受容体結合蛋白質である H 蛋白質、そして、粒子形成にかかわる M 蛋白質、そして、ポリメラーゼ機能を持つ L 蛋白質の変化によって引き起こされる。

H 蛋白質の変化により、ワクチン株はヒトの有核細胞の全てに発現している CD46 分子を利用できるようになっており、その変化に

より様々な培養細胞で増殖できるようになる。CD46 を効率よく利用するように変化するためには、H 蛋白質のアミノ酸の複数個の変異が必要であり、特に N481Y の変異は不可欠で、それに加えて N390I、N416D、T446S、T484N、E492G の変異が関係している(図 7)。

一方、M 蛋白質の変化でも、MeV が hSLAM の発現の無い細胞で増殖する。この変化を規定しているアミノ酸変異は、P64S と E89K である(図 8)。このふたつのアミノ酸置換によって、M 蛋白質が H 蛋白質の細胞内領域と強く結合するようになり、ウイルスの粒子形成効率を約 100 倍高めることが分かった。この粒子形成効率の向上によって、hSLAM が発現していない細胞でも(非効率的な侵入を利用して) MeV が増殖できるように変化するのである。一方、これらの変異は、hSLAM が発現した本来の宿主細胞での増殖能を低下させていた。その理由は、M 蛋白質が H 蛋白質に強く結合することにより hSLAM 陽性細胞で引き起こされる H 蛋白質と F 蛋白質による膜融合を阻害するためであり、このことがワクチン株の弱毒化の一因になっている可能性が示唆された。

アミノ酸の同定には至っていないが、ワクチン株の L 蛋白質も同様に培養細胞での増殖にかかわっている。この変化により M 蛋白質で観察したのと同様に、ワクチン株の L 蛋白質は、本来の hSLAM 陽性細胞での増殖能の低下を招くようであり、それがワクチン株の弱毒化と関連しているかもしれない。

C 蛋白質欠損 MeV のサル感染実験の解析から、C 蛋白質が MeV の病原性発現に不可欠であることが明らかとなった。また、培養細胞を用いた詳細な解析から C 蛋白質を発現することにより、MeV が宿主の自然免疫(特にインターフェロン)の発動を抑制していることが明らかになり、SeV の解析結果との比較が注目された(図 9)。

#### (8) MeV 小動物感染モデルの開発に関して

hSLAM 分子は、MeV のウイルス受容体である。V 領域が、MeV の受容体機能に必要十分である。マウスもマウス(m)SLAM を発現しているが、アミノ酸配列の違いによって mSLAM に MeV は結合できない。そこで、mSLAM の V 領域だけを hSLAM の相同領域と置き換えたノックインマウスを作成した。作成したノックインマウスは、健康に生育し、免疫学的にも明らかな異常は認めなかった。ノックインマウスから得た脾臓やリンパ節の

細胞に、MeV が効率よく感染することが明らかになった。しかしながら、マウスに直接接種した場合には、MeV は効率よく増殖することはできなかった。

IFN 系は、ウイルス増殖を阻害する宿主側の最も重要な自然免疫機構である。そこで、hSLAM ノックインマウスと、IFN 受容体ノックアウトマウスとを掛け合わせ、IFN 受容体ノックアウト hSLAM ノックインマウスを作成した。本マウスは、経鼻、経腹腔投与のいずれにおいても麻疹ウイルスへの感受性を示し、全身リンパ系臓器での MeV の増殖と、mitogen 刺激によるリンパ球の増殖を指標としたリンパ球機能の低下を引き起こすことを示した。本マウスを利用することにより、麻疹の病態解明が進むのみならず、MeV を利用したワクチンやベクター開発に多いに役立つと考えている。

#### (9) 分節型 MeV ベクターの開発

2 分節ゲノム型 2 外来性遺伝子搭載 MeV、3 分節ゲノム型 3 外来性遺伝子搭載 MeV、および 3 分節ゲノム型 5 外来性遺伝子搭載 MeV を作成した。3 種のウイルスともに培養細胞で効率よく増殖し、搭載した外来性遺伝子を効率よく発現した (図 10)。

また、20 継代後も、外来性遺伝子の発現やウイルスの性質に明らかに変化は認められず、すべての分節がバランスよく継代されたものと思われた。6 分節ゲノム型 6 外来性遺伝子搭載 MeV の作成を試みた。全てのゲノム分節を同一細胞内で同時に効率よく鋳型活性を有するリボ核蛋白複合体(RNP)にできることが分かり、培養細胞中に MeV に特徴的な多数の巨細胞の形成が起こることを確認した。しかしながら、これら巨細胞からの感染性 MeV 粒子の放出はほとんどなく、ウイルスを継代することはできなかった。

#### (10) ワクチン接種後に CDV 罹患したイヌの病理学的所見

CDV ワクチンを 2 回接種したにもかかわらず CDV に罹患した 3 匹のイヌについて病理学的検索を行った。主な所見は肺炎と軽度の胃腸炎であった。免疫組織学的検索では CDV 抗原が細気管支内またはその周囲で陽性であった。胃では病巣内に封入体を認めたのみで壊死はほとんどみられなかったものの、上皮細胞は広範囲に CDV 抗原陽性であった。

#### (11) 各臓器のウイルス分離とウイルス力価

CDV 感染イヌ No.1 では、扁桃と腸間膜リ

ンパ節で  $2.3 \times 10^3$  TCID<sub>50</sub>/ml の最も高いウイルス力価を示した。イヌ No.2 では最高値が扁桃と腸間膜リンパ節、No.3 では脾臓であった。No.1 の脾臓、No.2 の腸、No.3 の小脳から分離されたウイルスをそれぞれ P94S, Ac96I, S124C と名付けて、解析に使用した。

#### (12) 遺伝子系統樹解析

CDV 罹患イヌの臓器から分離した CDV から RT-PCR 法により P と H 遺伝子を増幅し、その塩基配列を決定した。塩基配列を遺伝子データベースに登録されている他の CDV 株の配列と比較して、系統樹解析を行った。P 遺伝子系統樹では接種されたデュラミンワクチンは Onderstepoort 株や SnyderHill 株と同じ古典的なグループに属しているのに対して、新分離 P94S, Ac96I, S124C 株は遠く離れたところに位置していた。H 遺伝子でも新分離株は同様にワクチン株とは遠く離れていた (図 11)。限界希釈によるウイルスクローニングを行った後、全ゲノムをシーケンストしたところ、全体は 15,690 塩基であり、6 の倍数になっていた。

#### (13) CDV ゲノムのクローニング

CDV の全遺伝子をそれぞれ 2.2Kb (FL1)、4.1kb (FL2)、5.1kb (FL3)、5.1kb (FL4)、3.5kb (FL5)、の 5 つの PCR フラグメントに分けてクローニングした。FL1 は T7 プロモーターを、また、FL6 は trailer とリボザイムをプライマーに含めてクローン化した。

#### (14) サポートングプラスミド

cDNA からの CDV 回収系を作成するには CDV に転写複製を司る N、P、L 遺伝子産物の供給が不可欠である。その為のサポートングプラスミドシステムとして N、P、L 遺伝子それぞれの PCR 産物 1.6、1.7、6.6kb を Topo ベクターにクローン化し、最終的に ISRE 配列の下流にそれぞれの蛋白質コード領域をリクローニングし、pEMC-Na、pEMC-Pa、pEMC-La を作成した。

#### D. 考察

本研究班は、当初 SeV のみで開始したが、2 年目からは MeV を、3 年目からは CDV を加えたパラミクソウイルスベクターの開発班として、SeV ベクター、MeV ベクター、CDV ベクターの三つについて取り組んだ。SeV ベクターは、ウイルスのゲノムをすべて残したままで、外来遺伝子を付加的に挿入する自立増殖型としてスタートした (図 12)。この自立

増殖型は、本来の SeV の性質を引き継いで広範囲な細胞で、多量の外来遺伝子産生が可能である。しかし、単純にベクターを物質生産目的で使用するのであれば、増えたウイルスが他に広がり得るといった性質は閉鎖環境を使うことにより克服可能であるが、特定の細胞でだけ発現させたい、あるいは、開放的な環境で使用し、周りにばらまく危険性があるならば、自立増殖型ベクターでは不都合である。そこで、ウイルスゲノムの転写複製に関係しない遺伝子を除き、それらをヘルパー細胞株から供給するという方法を使って、自立増殖できない欠損型ベクターを作製することを可能にした。欠損型ベクターは、M、F、HN 遺伝子を単独、あるいはいずれか二つ、あるいは三つ同時に除いた形になっている(図 12)。最低限ゲノムの転写と複製に必要な N、P、L 遺伝子を残したレプリコンの状態では細胞室内発現ベクターとして使うことができる。

しかし、P 遺伝子からは、P 蛋白質の他に、V と C 蛋白質が産生され、それらの蛋白質の機能がベクターの安全性にどのように関わるかを検証する必要がある。すでに V 蛋白質については、培養細胞で用いる限りは不必要であることが分かっている一方で、C 蛋白質の欠損はウイルス増殖が大きく損なわれ除く事ができない。そこで、本研究では、最近研究が進んだ C 蛋白質の抗 IFN 機能解析を基に、C 蛋白質が機能上除くことができないのならば、抗 IFN 能だけでもピンポイントで除けなしかを検討した。

ウイルスが細胞に感染すると数時間以内に IFN が分泌され、細胞が抗ウイルス状態になることが知られている。もしウイルスベクターに抗 IFN 能を残したまま使用した場合には、新たなウイルス感染に対して細胞が無防備な状態に置かれることになる。もし、この様なベクターを使用するならば、恒に”ウイルスベクターによる恩恵”と”抗ウイルス作用が働かないことによる危険”を天秤にかけて使わざるを得ない。その点で、SeV の C 蛋白質にある抗 IFN を除けるか否かの検証には意味がある。

培養細胞においては親株 SeV と変異 SeV Cm\* の増殖性の差は、およそ 1/10-1/20 となり、若干の低下が認められた。本来的に高い発現量を持つ SeV においては、この程度の低下はベクターの使用条件として実用上大きな問題点にならない。一方、マウスに経鼻的に接種した変異 SeV Cm\* は、ほとんど肺で増えることがなく接種後数日後には肺内のウイル

ス量が検出限界以下に低下した。これは、個体において IFN 系の自然免疫システムが生体防御上非常に重要な意味を持つ事を示している。

細胞で SeV ベクターを発現させる場合には、C 蛋白質の抗 IFN 能を欠損させてもそれほど大きな欠点にならず、むしろ開放環境中にベクターを利用する際に、もし環境中にベクターが飛散したとしても安全性向上に役立つものと思われた。しかし、SeV ベクター個体に投与することを意図するならば、SeV C 蛋白質の抗 IFN 能欠損は、簡単に生体から排除されてしまうのでベクター機能にとっては致命的欠点になると思われた。

SeV ベクターの実施例として SeV に H5 型インフルエンザウイルスの HA 遺伝子を組込んだ組換えウイルス SeV/tukH5 を作成し、インフルエンザウイルス HA 蛋白質を産生させた。感染細胞ではトリプシン非存在下でも発現 HA 蛋白質が HA1 と HA2 に開裂し、H5 型インフルエンザウイルス本来の HA 蛋白質の性質が、SeV/tukH5 で発現後も維持されていることが示された。

SeV/tukH5 で発現されるインフルエンザウイルス HA 蛋白質は、感染細胞にだけ見られるものではなく、SeV 粒子にも取り込まれることが示された。免疫電子顕微鏡像から SeV 粒子上に密にインフルエンザウイルス HA 蛋白質が存在する様には見えない事、また組換え SeV が抗 SeV 抗体で完全に中和される(結果未提示)ことから、この HA 蛋白質は特定のシグナルを使って選択的に SeV 粒子に取り込まれたものではなく、SeV が出芽時に宿主蛋白質の細胞膜をかぶる際にたまたま近傍にあった HA 蛋白質を取り込んだものと思われた。このようにして作成された組換え SeV が、インフルエンザウイルスに対する抗体を誘導し、ワクチンとして働くことが期待される。

野生型 MeV を合成し、組換える技術の開発により、MeV の病原性発現の機構、ワクチン株が弱毒化に至った分子的基盤を生きたウイルスを使って研究することができるようになった。いまや、MeV を組換えることは極めて容易になり、ベクター研究を初めてとしてウイルス学的研究が加速すると考えられる。MeV の弱毒化の分子基盤を解明すること並びに MeV ゲノムのさまざまな機能を理解することは、麻疹ワクチンを理解し、MeV の病原性発現の機構を知る上で重要である。これらから得られる知識は、新たなベクターや多価ワクチン開発に利用していく上で大いに役立つ



つと思われる。MeV の小動物感染モデルの作成は、ウイルスの病原性研究や、ワクチンの安全性試験に極めて有効である。hSLAM ノックインマウスの開発は、その大きな一歩であると考えている。

MeV のゲノムを分節化するという一見、ウイルスの増殖能に重大な影響を与えそうな改変は、少なくとも3分節まではウイルス増殖に大きな問題無く可能であった。むしろ、この改変により、多数の外来性遺伝子の挿入が可能になり、多外来性遺伝子搭載型 MeV ベクターを構築することが可能になった(図 12)。MeV を用いたベクターの開発には、いくつかの利点が考えられる。たとえば(1) 安全性の高い生ワクチン株があること、(2) 細胞質で増殖し宿主のゲノムに影響を与えないこと、(3) H 蛋白質を改変することにより特定の細胞を標的化することが可能であることなどがあげられる。

CDV と MeV はイヌとヒトという宿主の違いはあるもののウイルス分類学的に近縁のウイルスである。そのため、臨床材料からの CDV の分離は MeV を真似て B95a や Vero 細胞などが使用されてきた。しかし、MeV で最近蓄積された知見をあてはめると、イヌ固有のウイルス受容体を発現する細胞を用いないと、表現形質が変化した CDV を選択的に分離してしまう危険性があることになる。真に CDV ウイルスの性状を知りたい場合には、CDV のウイルスレセプターであるイヌ(c)SLAM 分子を発現する細胞を使う必要がある。そこで cSLAM を発現する Vero 細胞(Vero-DST)を作成し、それを用いて分離を行う事を試みた。従来 CDV は細胞株を用いて分離すると病原性が低下または消失すると言われていたが、Vero-DST 細胞を用いて分離された CDV はイヌへの病原性を保持していた。

この Vero-DST 細胞を使って手始めに CDV ワクチンを2回接種したにも関わらず CDV に罹患した3頭のイヌのウイルス学的検索を行った。臓器毎のウイルスの力価を調べた所、今まで病理組織学的に全身の感染症として捉えられていたものが、ウイルスの広がりからも全身感染であることが定量的に証明された。

ワクチンを接種したにもかかわらず CDV に感染するイヌがいる。CDV ワクチンの品質・管理の問題や移行抗体の存在があるためにワクチン定着に失敗した primary vaccine failure (1 次性ワクチン免疫不成立)の場合、または生ワクチンに含まれるの CDV の病原性が復帰するというワクチン品質上の問題の可

能性がある。ワクチン接種時の移行抗体を調べたところ陰性か低い抗体が存在するのみで、ワクチン接種に移行抗体の影響は無いことがわかった。また、状況証拠よりワクチン接種の技術的問題やワクチンの品質上の問題も否定された。

Vero-DST 細胞を使ったウイルス分離とウイルス中和試験成績から3匹のイヌから分離した CDV (P94S, Ac96I, S124C 株)は系統樹的にワクチン株から離れた新型株であり、その様な株に対してワクチン株による免疫では抗体価の減衰により十分な防御期間を得られない secondary vaccine failure (2 次性ワクチン免疫不成立)であったことが原因と結論した。新型株にも対応した CDV ワクチン開発が求められる。

SeV や MeV で代表されるように RNA ウイルスを cDNA としてクローニングし、その cDNA からウイルスを回収する事が可能になっている。一部の CDV では既に回収技術系が得られているが、Vero-DST 細胞のような cSLAM 発現細胞を用いた系ではないために回収ウイルスによって得られた知見は、細胞に馴化した特殊な CDV のみに当てはまる結果になっている。そのため Vero -DST 細胞で分離した CDV 007Lm株を使用し、ウイルス回収系の確立をめざしている。RT -PCR により CDV ゲノムを5つの断片に分けてクローニングし、T7 プロモーターと Ribozyme の間に順にフラグメントを組み込み完全長の cDNA を作出めざすとともに、ウイルス回収に必須な CDV N、P、L 蛋白質を発現するサポートプラスミド pEMC-Pa、pEMC-La、pEMC-Na についても作成を行った。本研究班の終了までに感染性クローン完成には至らなかったが、もし完成すれば MeV で行われた様な病原遺伝子の特定、弱毒化の機構を手本として研究が行え、新型の CDV に対するワクチンの設計が可能になると予想している。一方、ベクター開発についても先行する SeV あるいは MeV に倣って CDV ベクター系が確立できると考えている。

## E. 研究発表

### (1) 論文発表

加藤分担研究者

1. A. Kato, C. Cortese-Grogan, S. A. Moyer, F. Sugahara, T. Sakaguchi, T. Kubota, N. Otsuki, M. Kohase, M. Tashiro, and Y. Nagai. Characterization of the amino acid residues of Sendai virus C protein that are critically involved in its interferon antagonism and

- RNA synthesis down-regulation. *J Virol.* 76: 7114-7124 (2004).
2. Y. Nagai, and A. Kato. Accessory genes of the Paramyxoviridae, a large family of nonsegmented negative strand RNA viruses, as a focus of active investigation by reverse genetics, in press. *In* Y. Kawaoka (ed.), *Biology of Negative Strand RNA Viruses: The Power of Reverse Genetics*, Springer-Verlag GmbH and Co. KG, Curr. Topic Microbiol. Immunol 283: 198-248 (2004).
  3. Nishiyama, K., K. Takaji, K. Kataoka, Y. Kurihara, M. Yoshimura, A. Kato, H. Ogawa, and H. Kurihara. Id1 gene transfer confers angiogenic property on fully differentiated endothelial cells and contributes to therapeutic angiogenesis. *Circulation* 112: 2840-2850 (2005).
  4. Yoneyama, M., M. Kikuchi, K. Matsumoto, T. Imaizumi, M. Miyagishi, K. Taira, E. Foy, Y-M. Loo, M. Gale, Jr., S. Akira, S. Yonehara, A. Kato, and T. Fujita. Shared and Unique Functions of the DExD/H-Box Helicases RIG-I, MDA5, and LGP2 in Antiviral Innate Immunity. *J. Immunol.* 175(5): 2851-2858 (2005).
  5. Sakaguchi, T, A. Kato, F. Sugahara, Y. Shimazu Y, M. Inoue, K. Kiyotani, Y. Nagai, and T. Yoshida. AIP1/Alx is a binding partner of Sendai virus C protein and facilitates virus budding. *J. Virol.* 79: 8933-8941 (2005).
  6. Kubota, T., N. Yokosawa, S. Yokota, N. Fujii, M. Tashiro, and A. Kato. Mumps virus V protein antagonizes interferon without the complete degradation of STAT1. *J. Virol.* 79: 4451-4459 (2005).
  7. Fujita, S., A. Eguchi, J. Okabe, A. Harada, K. Sasaki, N. Ogiwara, Y. Inoue, T. Ito, H. Matsuda, K. Kataoka, A. Kato, M. Hasegawa, and M. Nakanishi. Sendai virus-mediated gene delivery into hepatocytes via isolated hepatic perfusion. *Biol Pharm Bull.* 29(8): 1728-1734 (2006).
  8. Goto, T., M. Morishita, K. Nishimura, M. Nakanishi, A. Kato, J. Ehara, and K. Takayama. Novel mucosal insulin delivery systems based on fusogenic liposomes *Pharmaceutical Research* 23: 384-391 (2006).
  9. Kiyotani, K., T. Sakaguchi, A. Kato, 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)
  10. Kato, A., 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 *J. Virol.* 81: in press (2007).
- 竹田協力研究者
1. Chen, B., Takeda, M., and Lamb, R. A. Influenza virus hemagglutinin (H3 subtype) requires palmitoylation of its cytoplasmic tail for assembly: M1 proteins of two subtypes differ in their ability to support assembly. *J Virol.* 79: 13673-13684, (2005).
  2. Tahara, M., Takeda, M., and Yanagi, Y. Contribution of matrix and large protein genes of the measles virus Edmonston strain to growth in cultured cells as revealed by recombinant viruses. *J Virol.* 79: 15218-15225, (2005).
  3. Takeda, M., Ohno, S., Seki, F., Hashimoto, K., Miyajima, N., Takeuchi, K., and Yanagi, Y. Efficient rescue of measles virus from cloned cDNA using SLAM-expressing Chinese hamster ovary cells. *Virus Res.* 108: 161-165, (2005).
  4. Takeda, M., Ohno, S., Seki, F., Nakatsu, Y., Tahara, M., and Yanagi, Y. Long untranslated regions of the measles virus M and F genes control virus replication and cytopathogenicity. *J Virol.* 79: 14346-14354, (2005).
  5. Takeuchi, K., Takeda, M., Miyajima, N., Ami, Y., Nagata, N., Suzaki, Y., Jamila, S., Kadota, S., and Nagata, K. Stringent requirement of the C protein of wild-type measles virus for growth both in vitro and in macaque. *J Virol.* 79: 7838-7844, (2005).
  6. Ohno, S., Ono, N., Seki, F., Takeda, M., Kura, S., Tsuzuki, T., and Yanagi, Y. Measles virus infection of SLAM (CD150) knock-in mice reproduces tropism and immunosuppression in human infection. *J Virol.* 81: 1650-1659, (2006).
  7. Nakatsu, Y., Takeda, M., Ohno, S., Koga, R., and Yanagi, Y. Translational inhibition and increased interferon induction in cells infected with a C protein-deficient measles virus. *J Virol.* 80: 11861-11867, (2006).
  8. Nakatsu, Y., Takeda, M., Kidokoro, M., Kohara, M., and Yanagi, Y. Rescue system for measles virus from cloned cDNA driven by vaccinia virus Lister vaccine strain. *J Virol Methods.* 137: 152-155, (2006).
  9. Takeda, M., Nakatsu, Y., Ohno, S., Seki, F., Tahara, M., Hashiguchi, T., and Yanagi, Y. Generation of measles virus with a segmented RNA genome. *J Virol.* 80: 4242-4248, (2006).
  10. Seki, F. Takeda, M., Minagawa, H., and

Yanagi, Y. The recombinant wild-type measles virus containing a single N481Y substitution in its hemagglutinin cannot use a receptor CD46 as efficiently as that having the hemagglutinin of the Edmonston laboratory strain. *J Gen Virol.* 87: 1643-1648, (2006).

11. Yanagi, Y., Takeda, M., and Ohno, S. Measles virus: cellular receptors, tropism and pathogenesis. *J Gen Virol*, 87: 2767-2779, (2006).
12. Yanagi, Y., Takeda, M., Ohno, S., and Seki, F. Measles virus receptors and tropism. *Jpn J Infect Dis*, 59: 1-5, (2006).

山口研究協力者

1. Lan NT, Yamaguchi R., Inomata A, Furuya Y, Uchida K, Sugano S, Tateyama S. Comparative analyses of canine distemper viral isolates from clinical cases of canine distemper in vaccinated dogs. *Vet. Microbiol.* 115: 32-42, (2006).

F. 知的財産権の出願・登録状況  
なし

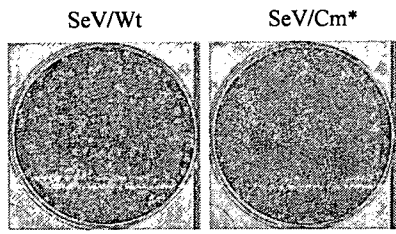


図1. 親株SeVと変異SeV/Cm\*のプラークの形状

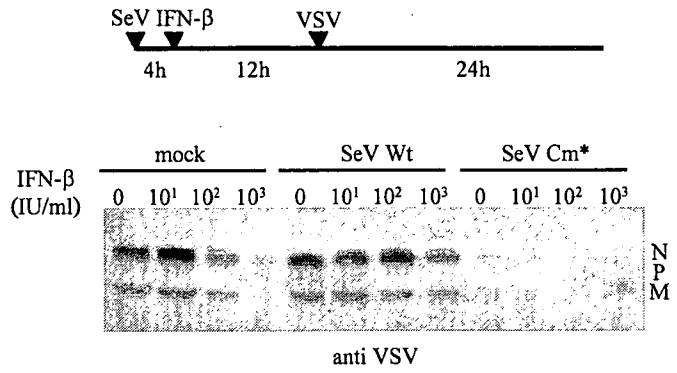


図2. 親株SeVと変異SeV/Cm\*の抗IFN能

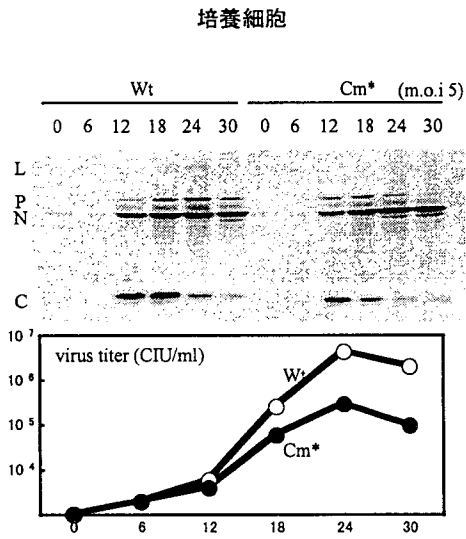


図3. 親株SeVと変異SeV/Cm\*の培養細胞での増殖

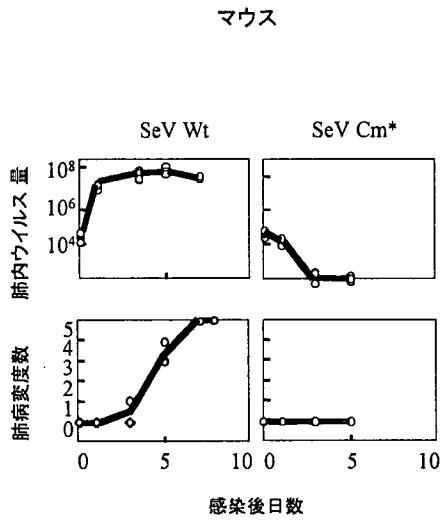


図4. 親株SeVと変異SeV/Cm\*のマウスでの増殖

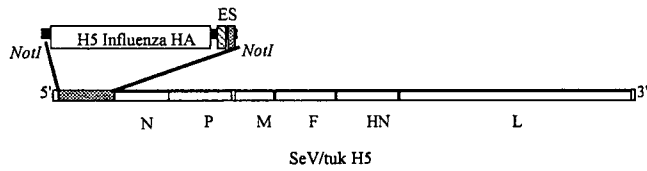


図5. インフルエンザHA遺伝子を組込んだSeVゲノムの模式図

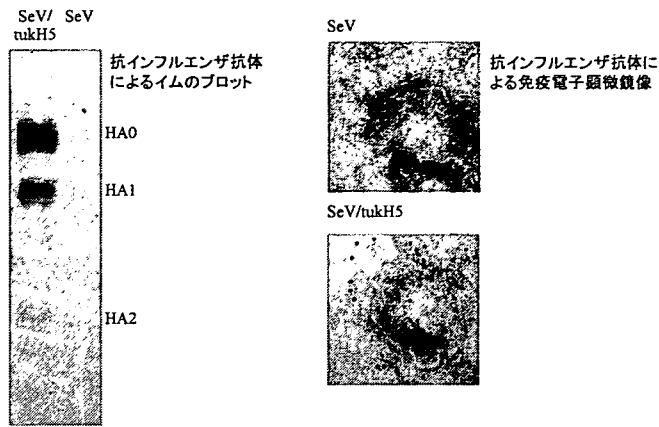


図6. SeVベクターで発現したインフルエンザHA蛋白質

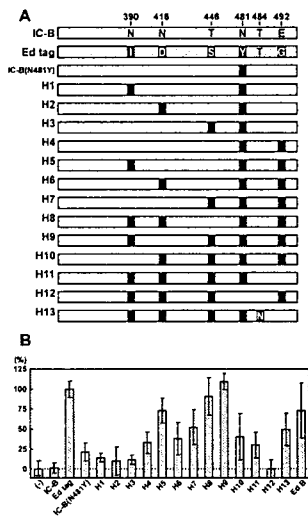


図7. ウイルス指向性決めるMeV H蛋白質

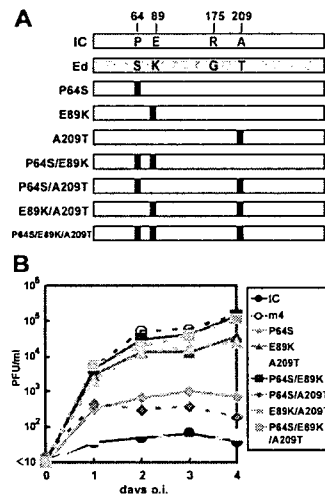


図8. 細胞での増殖性を決めるMeV M蛋白質

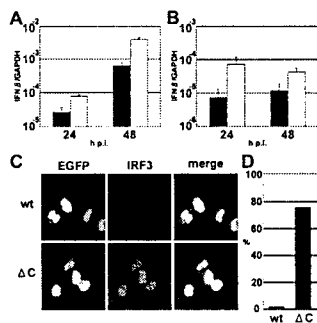


図9. 宿主自然免疫に関するMeV C蛋白質

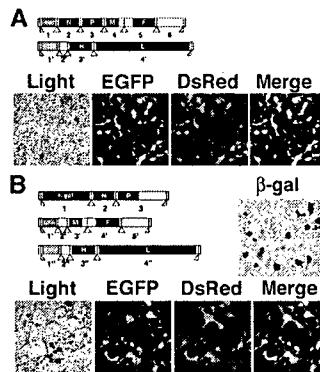


図10. 多分節型MeV発現ベクター

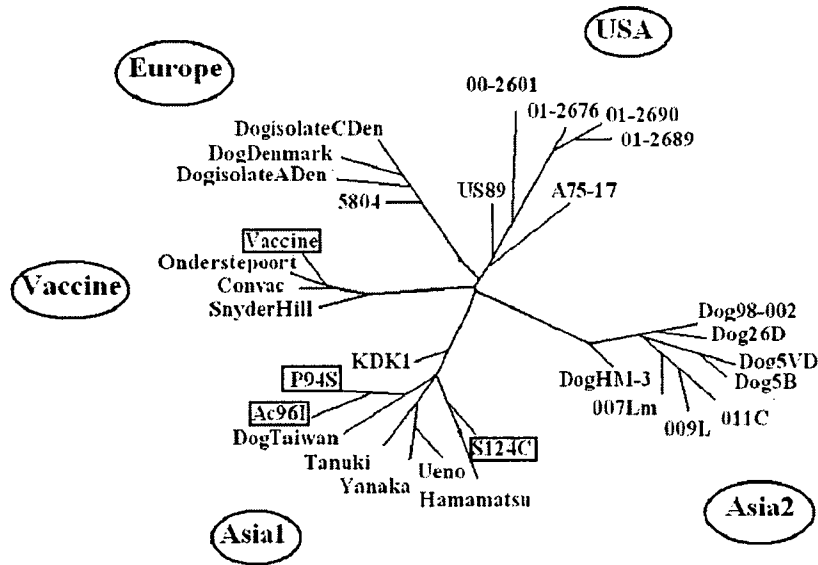


図11. 遺伝子解析に基づくCDVの系藤樹

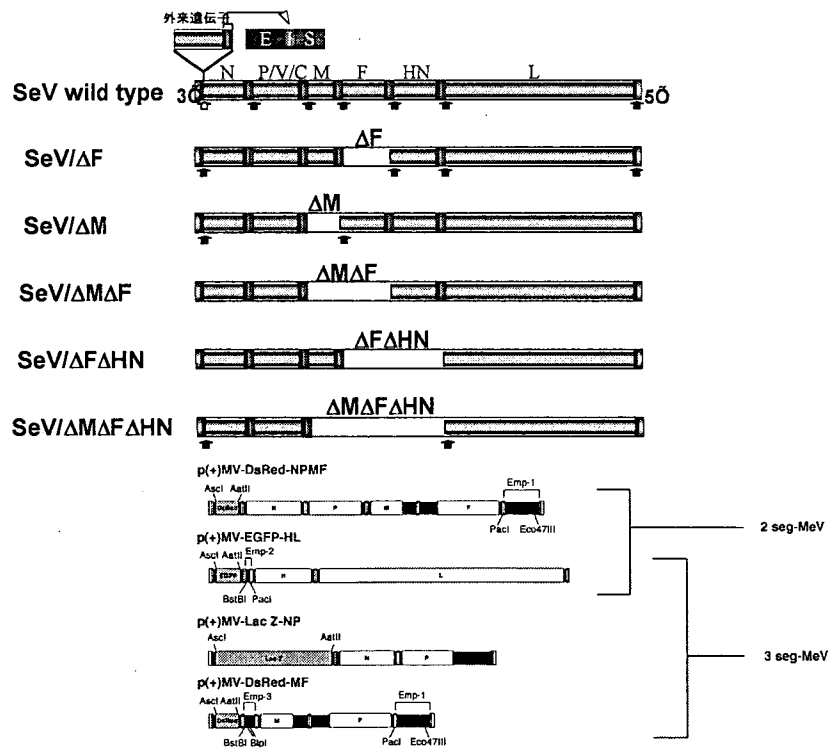


図12. SeVとMeVベクターの特徴とその型

## 日本脳炎ウイルス抗原を発現する組換え狂犬病ウイルス作製のための 日本脳炎ウイルス抗原遺伝子の増幅

分担研究者：高崎智彦（国立感染症研究所 ウイルス第一部 第二室）  
協力研究者：林 昌宏（国立感染症研究所 ウイルス第一部 第二室）  
伊藤睦代（国立感染症研究所 ウイルス第一部 第三室）  
倉根一郎（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、ウエストナイルウイルス、クンジンウイルスなどその抗原性が極めて類似している。ヒトに対する病原性のない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したウイルスベクターを用い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。ただし、初年度（平成 16 年度）は組換え DNA 実験申請中であったため、これらのワクチンを評価する小動物実験モデルの開発に着手した。我々は狂犬病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を抗原として選択し、さらに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。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、prM 蛋白質から NS1 蛋白質、NS1 蛋白質、NS3 蛋白質の各領域を増幅した。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

日本脳炎はフラビウイルス科フラビウイルス属の日本脳炎ウイルスによって発症する急性熱性脳炎である。日本脳炎ウイルスはエンペロープを有する直径 40-50nm の一本鎖プラス RNA ウイルスで、イエカ属の蚊によって媒介される。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いる。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。

日本脳炎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 及び E 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。一方、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り目的の細胞に外来蛋白質を発現させることが可能である。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マイナス RNA ウイルスである。狂犬病ウイルス HEP-Flury 株は培養細胞レベルで広い宿主域と高い増殖能をもつが、ヒトへの病原性は無い。また免疫抗原を発現する組換え狂犬病ウイルスを用いたワクチンは導入する免疫原が明確であり、汎用性も高く、目的抗原の導

入効率も良い。そこで我々は組換え狂犬病ウイルスを用いたワクチンの開発のモデルとして、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を選択した。

## B. 研究方法

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日本脳炎ウイルス中山株を用いた。培養細胞はサル腎由来のVero細胞を用いた。

$2.4 \times 10^9$  PFUの日本脳炎ウイルス培養上清からHigh Pure Viral RNA kitを用いてRNAを抽出した。次いでランダムプライマーを用いて逆転写酵素SuperScript IIIにより日本脳炎ウイルスのcDNAを作製した。PCR反応には5-AAAGCTAGCGAAGAATCGAGAGATTAGTGCAGT-3と5-TTTGCTAGCTTAGGCTCCTGCGCAGGCTAT-3 (C蛋白質), 5-AAAGCTAGCGAAGAATCGAGAGATTAGTGCAGT-3と5-TTTGCTAGCTTAAGCATGCACATTGGTCGCTAAGAA-3 (C蛋白質からE蛋白質), 5-AAAGCTAGCCACCGCCACCATGTGGCTCGCGAGCTTGGCA-3と5-TTTGCTAGCTTAAGCATGCACATTGGTCGCTAAGAA-3 (prM蛋白質からE蛋白質), 5-AAAGCTAGCCACCGCCACCATGTGGCTCGCGAGCTTGGCA-3と5-TTTGCTAGCTTATAGCACCATACCTCGCCAAAT-3 (prM蛋白質からNS1蛋白質), 5-AAAGCTAGCCACCGCCACCATGGCTTTGGCCTTCTTAGCCACA-3と5-TTTGCTAGCTTATAGCACCATACCTCGCCAAAT-3 (NS1蛋白質), 5-AAAGCTAGCCACCGCCACCATGATTGTTCCCGCCGCTTTTGGTTAT-3と5-TTTGCTAGCTTATCTCTTCCCTGCTGCAAAGTC-3

(NS3蛋白質)を用いて行った。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た。目的蛋白質の発現確認は蛍光抗体法を用いて行った。リコンビナント狂犬病ウイルスの作製のため日本脳炎ウイルス、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。

## C. 研究結果

RT-PCRによる日本脳炎ウイルスの目的遺伝子の増幅:  $2.4 \times 10^9$  PFUの日本脳炎ウイルス培養上清からRNAを抽出した。抽出したRNAをランダムプライマーを用いて逆転写し、日本脳炎ウイルスの目的遺伝子を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), prM蛋白質からNS1蛋白質 (3236bp), NS1蛋白質 (1235bp), NS3蛋白質 (1856bp) の各目的遺伝子を得ることが出来た。これらの遺伝子を狂犬病ウイルスベクターに導入し、日本脳炎ウイルス抗原組換え狂犬病ウイルスベクターを作製した。本研究の主たる目的は日本脳炎ウイルス抗原を発現する組換え狂犬病ウイルスを作製し、その性状、効果および安全性を明らかにするために日本脳炎ウイルスの各抗原領域の遺伝子を増幅し導入、評価することである。その結果C蛋白質, C蛋白質からE蛋白質, prM蛋白質からE蛋白質, prM蛋白質からNS1蛋白質, NS1蛋白質, NS3蛋白質の各領域の遺伝子をRT-PCRにて増幅し目的遺伝子である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、その発現を蛍光抗体法により確認した。また、各目的遺伝子をそれぞれ狂犬病ウイルスベクターに導入した。

## D. 考察

本研究の目的は狂犬病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を発現する組換え狂犬病ウイルスの作製のために、日本脳炎ウイルスの各抗原遺伝子を増幅することである。その結果C蛋白質, C蛋白質からE蛋白質, prM蛋白質からE蛋白質, prM蛋白質からNS1蛋白質, NS1蛋白質, NS3蛋白質の各領域の遺伝子を増幅した。

日本脳炎ウイルス遺伝子は約11kbの一本鎖RNAからなり、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。中和抗体誘導に関わる蛋白質はprM及びEであり、現在用いられている日本脳炎不活化ワクチンはこれらの構造蛋白質から構成されて



いる。これに対して CTL エピトープを含むと報告されている主な蛋白質は構造蛋白質 E 及び非構造蛋白質 NS3 である。

組換え狂犬病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 蛋白質までの遺伝子のみならず、C 蛋白質、prM 蛋白質から E 蛋白質、prM 蛋白質から NS1 蛋白質、NS1 蛋白質、NS3 蛋白質の各領域を選択した。各抗原を発現する組換え狂犬病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と考える。

今後、増幅した各日本脳炎ウイルス抗原の遺伝子を用いて組換え狂犬病ウイルスを作製し、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病ウイルスを用いたワクチン開発モデルを確立する。

#### E. 結 語

日本脳炎ウイルス抗原を発現する組換え狂犬病ウイルスを作製するために、導入すべき日本脳炎ウイルス遺伝子の作製を行った。今後はそれらの遺伝子を組換え狂犬病ウイルスに導入し、免疫原性を確認する。また、われわれのところでは分離同定したマウスに対して病原性が低いフラビウイルスである Yokose ウイルスの導入準備も開始した。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Shigeru Tajima, Tomohiko Takasaki, Shigeo Matsuno, Mikio Nakayama, Ichiro Kurane. Genetic characterization of Yokose virus, a flavivirus isolated from the bat in Japan. *Virology* 332: 38-44 (2005)

Masaru Kuwayama, Mikako Ito, Shinichi Takao, Yukie Shimazu, Shinji Fukuda, Kazuo Miyazaki, Ichiro Kurane, Tomohiko Takasaki. Detection of Japanese encephalitis virus genome in cerebrospinal fluids from meningitis patients in Japan. *Emerg. Infect. Dis.* 11(3): 471-473 (2005)

##### 2. 学会発表

桑山 勝、伊藤美佳子、高尾信一、島津幸枝、福田伸治、宮崎佳都夫、倉根一郎、高崎智彦 小児髄膜炎患者からの日本脳炎ウイルス遺伝子検出 第 52 回日本ウイルス学会総会 横浜市 2004 年 11 月

田島 茂、高崎智彦、江下優樹、倉根一郎 日本で分離された Yokose ウイルスの性状解析 第 38 回日本脳炎ウイルス生態学研究会 神戸市 2004 年 6 月

田島 茂、伊藤美佳子、高崎智彦、倉根一郎 デングウイルス 1 型完全長 cDNA クロンの作成およびウイルス産生系の確立 第 52 回日本ウイルス学会総会 横浜市 2004 年 11 月

貫井 陽子、田島 茂、小滝 徹、根路銘 令子、高崎 智彦、倉根 一郎 日本脳炎ウイルス genotype 1 型完全長 cDNA クロンの作製とウイルス産生系の確立 第 54 回日本ウイルス学会学術集会 名古屋市 2006 年 11 月

## 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：倉根一郎（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）

高崎智彦（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。この結果から、白色系スナネズミを用いてデングウイルス 2 型を皮下接種した後、6 カ月後にデングウイルス 1 型を接種し、抗体依存性感染増強効果の再現性を検討した。しかし、デングウイルス皮下接種法では、抗体依存性感染増強効果は認められなかった。

#### 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 RT-PCR および IgG ELISA を実施した。また接種方法を皮下接種に変えて白色系 (Mg-W) のスナネズミ 6 匹に、デングウイルス (1 型  $10^7$  pfu/mL) 液を接種した。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、体重や体温を測定し、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、

6ヶ月後血中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 RT-PCR およびIgG ELISA を実施した。さらに、4ヵ月後デングウイルス3型感染GK細胞を再び腹腔内接種し、ウイルス血症の有無、体重や体温を測定した。

#### 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ヶ月後に接種した結果、ウイルス血症が確認された。TaqMan RT-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。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)。さらにスナネズミを用いた感染実験において、デングウイルス2型ウイルス液の皮下接種した場合には明確なウイルス血症を確認することは出来なかった。さらに異なる血清型(1型)のデングウイルスを6ヶ月後に皮下接種したがTaqMan RT-PCRの結果は、Ct値39以上であり、ウイルス血症は確認されなかった。その4ヵ月後にデングウイルス3型感染GK細胞を腹腔内接種した結果も、明確なウイルス血症は確認されなかった。しかし、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。また、デングウイルス3型感染GK細胞を接種した後、体温上昇を示したが、ウイルス血症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。しかし、接種ルートによっても左右されるのか、皮下接種では明らかなウイルス血症は検出できなかった。デングウイルス感染症を研究する上でスナネズミは、接種ウイルス株や接種法を工夫すること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く、今後さらに検討する必要があると思われる。

#### 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という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

## ヘルペス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 第四室）

**研究要旨** 本研究では、新規ワクチンの評価法の開発の一環として、レトロウイルスとヘルペスウイルスの糖蛋白をモデルとしてVSVシュードタイプウイルスの作製とその応用について検討を加え、1) マウス白血病ウイルス (MLV) env糖蛋白の場合、MLV粒子内と同様なプロテアーゼ分解産物により高い感染効率が得られること、2) 単純ヘルペスウイルス (HSV) の場合、糖蛋白B(gB), gD, gH, gLの組合せが感染のために必須十分であること、3) MLV envとヘルペスウイルスの個別の糖蛋白を組合せることにより抗体価を測定できることなどを見出した。また、公衆衛生の観点から先天性CMV感染症に対するワクチン開発のための感染動物モデルとして、小動物で唯一経胎盤感染を起しえるモルモットCMVに着目し、GPCMVの感染動態、全塩基配列の決定、特異的抗体の作製を行った。

### 研究目的

ヘルペスウイルス科に分類される各ウイルスの場合、ウイルスごとにその初感染及び再活性化の病態も潜伏感染の標的となる細胞の種類も異なる。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。妊婦のHSV初感染ないしは再活性化に伴う産道感染により新生児ヘルペスはおこる。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、先天性サイトメガロウイルス (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発達障害をもたらされるものである。HSVは、マウスなどの小動物に感染し、ヒトと同様な病態を呈することから、in vivoでのワクチン評価は容易であるが、CMVは、宿主特異性が高く、ヒトCMV(HCMV)を用いた小動物感染モデルがない。また、先天性感染は、胎盤の構造との関係でモルモットないしはサルCMVを用いないと評価できない。本研究では、HSV及びCMVに対する新規ワクチンの評価法を確立することを中心として、1) 簡便な中和抗体価測定を開発すること、2) モルモットCMV(GPCMV)による先天性感染モデルを利用するのに必要な方法論を開発することを行った。

### 研究方法

1) 細胞及びウイルス：ヒト 2 倍体細胞 HLF(human lung fibroblast: CDC 組織培養施設より分与)は、10%牛胎児血清 (FBS) 添加 Dulbecco's MEM (DMEM) 培地にて培養した。VZV P-Oka 株 (山西弘一博士より分与) の培養には HLF 細胞を用いた。テロメラーゼ遺伝子により不死化されたヒト繊維芽細胞 hTERT-BJ1 (Invitrogen) は、10%牛胎児血清 (FBS) 添加 DMEM:199(4:1) 培地にて培養した。HCMV AD169 株及び Towne 株 (ATCC より購入) は、hTERT-BJ1 細胞にて培養した。モルモット肺由来繊維芽細胞 (GPL) JH4 clone 1(ATCC CCL-158) は、10%仔牛血清を含む Ham's F12 培地にて培養した。GPCMV は ATCC より購入し (VR682)、GPL 細胞を用いて増殖させた。

2) ヘルペスウイルスゲノム DNA の調製: VZV、CMV、GPCMV 感染細胞より、Straus らの方法に従いゲノム DNA を nucleocapsid DNA として精製した。即ち、感染細胞を集め、界面活性剤を含む緩衝液で溶解後、細胞由来の核酸を酵素分解し、ここからウイルスキャプシドを含む分画を超速心により回収後、プロテアーゼ処理、フェノール抽出によりキャプシドにパッケージングされていたウイルスゲノムの DNA を精製した。

3) 糖蛋白発現系の構築: HSV の糖蛋白発現系