

についてはすでに報告した (Koyano et al., 2003)。VZV 及び CMV の糖蛋白遺伝子は PfuI ポリメラーゼを用いてゲノム DNA を鋳型として PCR により増幅し、pcDNA3 及び pCAGGS にクローニングした。Ecotropic MLV の env 蛋白遺伝子は MLV ゲノムの一部を含むプラスミドよりクローニングした。すべてのプラスミドクローンについてその ORF の塩基配列を確認した。VZV 糖蛋白 B (gB), gH, gE, gI に対するモノクローナル抗体、CMV gB, gH に対するモノクローナル抗体 (Chemicon) 及び CMV gM ペプチドを KLH 蛋白に結合し免疫して得たウサギ抗体 (Koyano, Inoue 未発表) を用いて蛍光抗体法にて各蛋白の発現を確認した。

4) VSV シュードタイプの作製: 293T 細胞に各糖蛋白発現プラスミドを磷酸カルシウム法にて導入し、24 時間後 VSV- $\Delta$ G\* (M Whitt 博士より分与) を MOI=3 で感染し、その 20-24 時間後に感染上清を集め 0.45 $\mu$ m フィルターによりろ過し、シュードタイプウイルスを得た。シュードタイプの評価にはヒト由来細胞株である HeLa, 293T, U373MG, hTERT-BJ1, MeWo, BSC40、マウス由来細胞株 NIH3T3、ラット由来細胞株 XC1、ハムスター由来細胞株 CHO などを用いた。MLV env 及び CMV gB のシュードタイプウイルスは、5、20 及び 50% ショ糖の 3 層を使用したステップグラジエント遠心により精製した。

#### 5) 各臓器中の GPCMV 量の測定

4-5 週齢のモルモットの腹腔中に  $1 \times 10^6$  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 DNA Mini 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。

6) GPCMV 塩基配列の決定: GPCMV ゲノム DNA を制限酵素 EcoRI, HindIII, BamHI, XbaI, SacI, BglII で切断後、pBluescriptKS(+)-II (Stratagene) にクローニングして、それぞれのプラスミドライブラリーを構築した。これらのプラスミド DNA を BigDye Terminator cycle sequencing kit (Applied) にて反応し、キャピラリーシーケン

サーにて塩基配列を決定した。塩基配列は Genetyx ソフトにて解析した。プラスミドでカバーできなかった 2 箇所の小さな領域については、PCR 断片を用いて決定した。

8) GPCMV 前初期蛋白 (GPCMV-IE) に対する抗体の作製: HCMV の前初期蛋白とアミノ酸配列に類似性のある領域の DNA を pGEX6 プラスミドにクローニングし、大腸菌 BL21 株において、GPCMV-IE と GST 蛋白の融合蛋白として発現させた。IPTG により蛋白発現を誘導後、菌体を超音波破碎後低速遠心し、可溶性分画を得た。この分画中の GST 融合蛋白をグルタチオンカラムに結合させ、presission protease にて GPCMV-IE 部分を切り出し精製した。この精製蛋白をウサギで免疫し、特異抗体を得た。

#### 研究結果

##### 1. VSV シュードタイプを用いた中和抗体価測定法の開発

VSV シュードタイプは、中和エピトープの解析をはじめ、吸着や侵入といった感染初期におけるウイルス糖蛋白の機能解析にも用いられてきた。しかしながら、方法論的には、1 ないし 2 種類の外来糖蛋白を有するシュードタイプウイルスのみしか報告されておらず、外来糖蛋白としてどこまでの数や組合せを導入したシュードタイプが検出可能なウイルスとして作製できるかは不明である。また、報告されているシュードタイプは、導入した外来糖蛋白に依存して感染が成立するもののみであり、中和の標的になるなど感染に関与していても感染力のあるシュードタイプウイルスを単独では作製できないような糖蛋白に対する解析方法は報告されていない。さらに、本来の糖蛋白よりも VSV-G 由来の膜貫通ドメイン及び細胞質ドメインとキメラにした蛋白の方がシュードタイプへの取り込み効率が良くなった事例が報告されているが、すべてのウイルス糖蛋白に普遍化できるかについては不明である。本研究ではこれらの点についてレトロウイルスとヘルペスウイルスをモデルに検討を行った。具体的には、1) レトロウイルスであるマウス白血病ウイルス (MLV) の env 蛋白、ヘルペスウイルス科の単純ヘルペスウイルス (HSV)、水痘帯状疱疹ウイルス (VZV)、サイトメガロウイルス (CMV) の主要な糖蛋白の遺伝子発現系を確立するとともに、2) MLV env と VSV-G とのキメラ蛋白の解析により VSV-G 由来

ドメインの必要性を検討した。さらに、3) ヘルペスウイルス糖蛋白を数種類組合せることにより感染性VSVシュードタイプウイルス作製が可能かを検討し、4) 単独で感染性のVSVシュードタイプとならない個別の糖蛋白とMLV env蛋白とを組合せることにより感染性となるシュードタイプを作製することで特異的な抗体価測定に用いる方法を検討した。

#### 1) HSV糖蛋白によるシュードタイプ

HSVでは、各糖蛋白遺伝子をノックアウトした組換え体HSVの解析からgB, gD, gH, gLが感染に必須であることが知られている。また、これら4つの糖蛋白の組合せにより細胞融合が引き起こされることも報告されている。そこで、本研究では、この4つのHSV糖蛋白を組合せたシュードタイプがフリーなウイルスとしての感染力をもつかを検討した。その結果、4つの糖蛋白全てが発現された場合にのみ感染性のあるシュードタイプが産生されることを見出した(図1)。このシュードタイプは中和能をもつ抗gBモノクローナル抗体により感染が阻害されたが、中和能のないモノクローナル抗体では感染阻害が起こらなかった。また、シュードタイプウイルス感染の際10mM塩化アンモニウム処理を行うと、バックグラウンドの感染が低下しエンドサイトーシスに依存しないHSVに特異的な感染のみが測定できた。従って、4つのHSV糖蛋白によるシュードタイプウイルスは本来のHSVの感染様式を反映していると考えられる。

#### 2) VZV、CMV糖蛋白によるシュードタイプ

VZV gB, gH, gL, gE, gI, gC, gM, gN CMV gB, gH, gL, gO, gM, gN, gp42などの糖蛋白遺伝子のクローニングを行い、塩基配列を確認した。293T及びCHO細胞株に一過性のトランスフェクションを行い、各蛋白に対する特異抗体を用いた蛍光抗体法にて蛋白発現を確認した。

これらのCMVもしくはVZV糖蛋白を様々に組合せて発現させ感染性のあるシュードタイプウイルスの作製を試みたが現在までのところHSVと同等レベルの感染性を有するものを作製するには至っていない。また、いずれの糖蛋白自体もHSVシュードタイプウイルス形成は阻害しなかった。

#### 3) ML Venv蛋白によるシュードタイプ

Ecotropic (マウス・ラットに感染するがヒト細胞に感染しない) MLVのenvとVSV-Gとのキメラ蛋白を発現させ、VSVシュードタイプとして

の感染性をNIH3T3細胞で検討したところ、MLVのプロテアーゼにて切断されるカルボキシル末端19アミノ酸部位を欠失させたものがVSV-Gとのキメラに比べても感染性が高かった(図2)。このシュードタイプウイルスはヒト由来の細胞株に感染性はなかった。

#### 4) MLV envとCMV gBによるシュードタイプ

MLV envをHSV gB, gD, gH, gLと組合せてもシュードタイプの感染性は変化しなかった。そこで、MLV envとCMV gBの組合せでVSVシュードタイプを作製し精製後、CMV gBに対する抗体を用いてウエスタンブロッティング法によりgBが精製粒子中に含まれているかを確認したところ、CMV gBは本来のCMV粒子中に含まれるのと同様に、プロテアーゼで切断された2蛋白として検出された。

次に、補体存在下で特異性がすでに解析済みのヒト血清パネルをMLV envとCMV gBのシュードタイプと反応させ、その感染阻害について検討した。その際、ゲノムタイプの異なるAD169株及びTowne株由来のgBにより作製したシュードタイプも比較した。その結果、血清希釈10倍においてCMV陰性血清によるシュードタイプに対する感染阻害は5%以下であった。一方、CMV陽性血清ではシュードタイプ感染が20-95%の範囲で阻害された(図3)。この感染阻害はCMV Towne株を用いて測定した中和抗体価に相関した。

## 2. モルモットCMV感染モデルに必要な方法論の開発

### 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。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4)。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抗体で染色陽

性となる細胞数は少なかった。

### 3) GPCMVの全塩基配列の決定

GPCMVゲノムは、約24万塩基からなり、両端に約950塩基の繰返し配列を有した。その配列は、マウスやラットCMVよりも、TupaiaやRhesus CMVに近かった。ゲノムの中央部分に他のCMVと似たコア配列があり、コアの両側は比較的相同性の低い配列であった(図5)。

### 3) 前初期蛋白に対する抗体の作製

HCMVの前初期蛋白IE2と相同性が明確な280アミノ酸領域をGST融合蛋白として大腸菌で発現させ、精製後、ウサギを免疫して特異抗体を得た。GPCMVのIE蛋白は、分子量が約120kDaで(図6)、感染細胞の核に存在していることが確認された。また、GPCMV感染動物のパラフィン固定病理組織の染色にも利用できることが確認された。

### 考察

HSV gB, gD, gH, gLの組合せにより作製したVSVシュードタイプが感染性をもち、どのひとつのHSV糖蛋白を欠いても感染力を失うことを示した。この結果は、4つの糖蛋白の組合せがHSV感染に必須十分であるとする細胞融合系の実験に基づく推測を細胞フリーのウイルス感染によりはじめて実証したことになる。HSV糖蛋白を用いたシュードタイプウイルスは、HSVの増殖が早いことから、実用的な利便は発生しない。しかしながら、今後、gBやgDに変異を導入したシュードタイプを迅速に作製できることから、HSV感染に必須な蛋白ドメインや中和エピトープの迅速な解析に利用できると考えられる。さらに、MLV env蛋白と組合せることにより単独で感染性VSVシュードタイプを作製できないようなCMV gBに対する抗体価を感染粒子に近い立体的条件で検討できること、また、ゲノムタイプの異なるgBを並行して検討できることを示した。

GPCMVの感染動物内での分布は、ヒトの感染で剖検例などから得られている知見と一致している。また、唾液線に大量のゲノムDNAが検出されなど、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、今後感染モルモットからの尿の採取を試みたい。

GPCMVの全塩基配列の解析により、今後各

遺伝子をロックアウトしたような組換えウイルスの作出が可能となり、動物個体での増殖性や病原性を規定する遺伝子の同定など様々な研究を展開することが可能となった。

### F. 健康危険情報

なし

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

N. Inoue, T. Spira, L. Lam, J.L. Corchero, W. Luo. Comparison of serologic responses between Kaposi's sarcoma-positive and -negative men who were seropositive for both human herpesvirus 8 and human immunodeficiency virus. *J. Med. Virol.* 74: 202-206 (2004)

L.T. Krug, V.P. Pozharskaya, Y. Yu, N. Inoue, M.K. Offermann. Inhibition of infection and replication of human herpesvirus 8 in microvascular endothelial cells by alpha interferon and phosphonoformic acid. *J Virol.* 78: 8359-71 (2004)

V. Pozharskaya, L.L. Weakland, J.C. Zimring, L.T. Krug, E.R. Unger, A. Neisch, H. Joshi, T. Kroll T, N. Inoue, Offermann MK. The impact of viral interferon regulatory factor-1 expression on responsiveness to interferon alpha and the production of infectious human herpesvirus 8 by BCBL-1 cells. *J.Virol.* 78: 6621-6635 (2004)

S. Koyano, A. Araki, Y. Hirano, K. Fujieda, T. Suzutani, K. Yagyu, K. Murono, N. Inoue. Retrospective diagnosis of congenital cytomegalovirus infection using dried umbilical cords. *Ped. Infect. Dis. J.* 23: 481-482 (2004)

F.-X. Mbopi-Keou, H. Hocini, J. Legoff, C. Picketty, J.-E. Malkin, N. Inoue, *et al.* Salivary production of IgA and IgG to human herpesvirus 8 latent and lytic antigens in individuals with resolved Kaposi's sarcoma. *AIDS* 18: 338-340 (2004)

Wang G, Xu H, Wang Y, Gao X, Zhao Y, He C, Inoue N, Chen HD. 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 (2005)

L.T. Krug LT, C.G. Teo, K. Tanaka-Taya, N. Inoue. Newly identified human herpesviruses. pp. 197-276. *In: (Eds) IW Fong, K Alibek Emerging Infectious Diseases of the 21<sup>st</sup> Century. Springer, NY (2006)*

N. Kumar, K. McLean, N. Inoue, D.R. Moles, C. Scully, S.R. Porter, C.G. Teo. Herpesvirus 8 genoprevalence in people at disparate risks of Kaposi's sarcoma. *J. Med. Virol.* 79: 52-59 (2007)

H. Ogawa, T. Suzutani, Y. Baba, S. Koyano, N. Nozawa, K. Ishibashi, K. Fujieda, N. Inoue, K. Omori. Etiology of severe sensorineural hearing loss in children: independent impact of congenital cytomegalovirus infection and GJB2 mutations. *J. Infect. Dis.* 195 782-788 (2007)

N. Nozawa, S. Koyano, Y. Yamamoto, Y. Inami, I. Kurane, N. Inoue. A real-time PCR assay using specimens on filter discs as a template for detection of cytomegalovirus in urine. *J. Clin. Microbiol.* (in press, 2007)

井上直樹、野澤直樹 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 (2006)

野澤直樹、井上直樹 CMV の先天性感染機構 *日本臨床* 64 巻増刊号 3: 446-450 (2006)

## 2. 学会発表

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

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

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. 12<sup>th</sup> International Conference on Immunobiology and Prophylaxis of Human Herpesvirus Infections. Osaka, Oct. 6-8, 2005

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. 12<sup>th</sup> International Conference on Immunobiology and Prophylaxis of Human Herpesvirus Infections. Osaka, Oct. 6-8, 2005

N. Inoue, T. Suzutani, H. Ogawa, S. Koyano, Y. Baba, H. Yan, K. Ishibashi, Y. Yamamoto, Y. Inami, N. Nozawa, K. Omori, K. Fujieda, I. Kurane. Epidemiology of congenital CMV infection in pediatric patients with severe sensorineural hearing loss: prevalence, viral loads, and genotypes. The 31st International Herpesvirus Workshop, Seattle, 2006

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

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

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

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

野澤直樹, 古谷野伸, 倉根一郎, 井上直樹 尿・唾液などの液体試料を塗布した濾紙片を直接使用したリアルタイムPCR法の開発: 尿中のCMV検出を実例として 第54回日本ウイルス学会学術集会 名古屋市 2006年11月

H. 知的財産権の出願・登録状況  
なし

図1 HSV糖蛋白によるVSVシュードタイプ

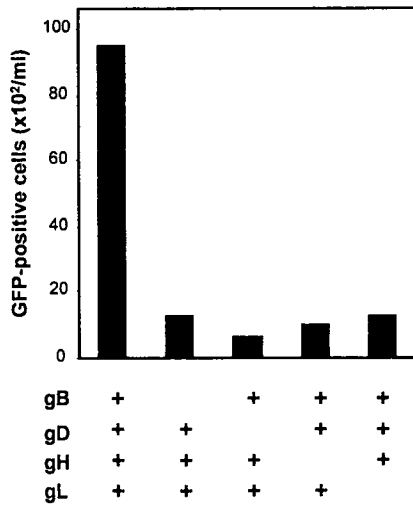


図2 MLVenv蛋白によるシュードタイプ

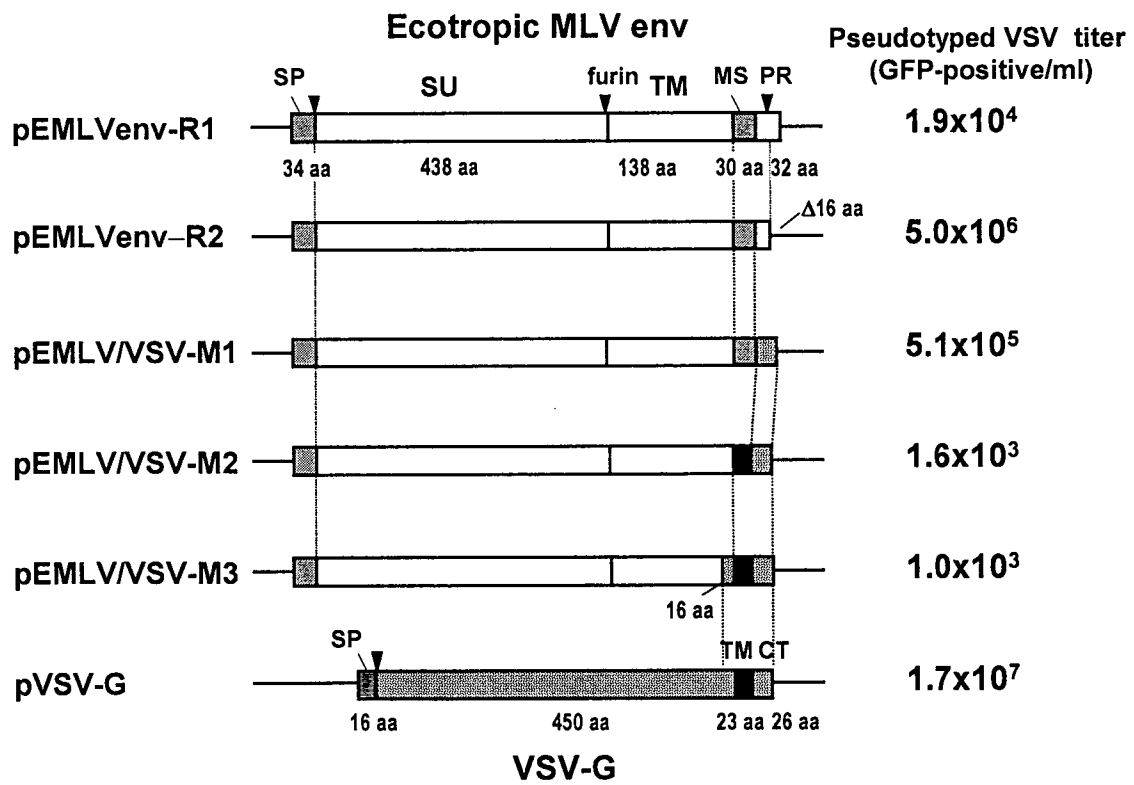


図3 シュードタイプを用いたCMVgBに対する抗体の検出

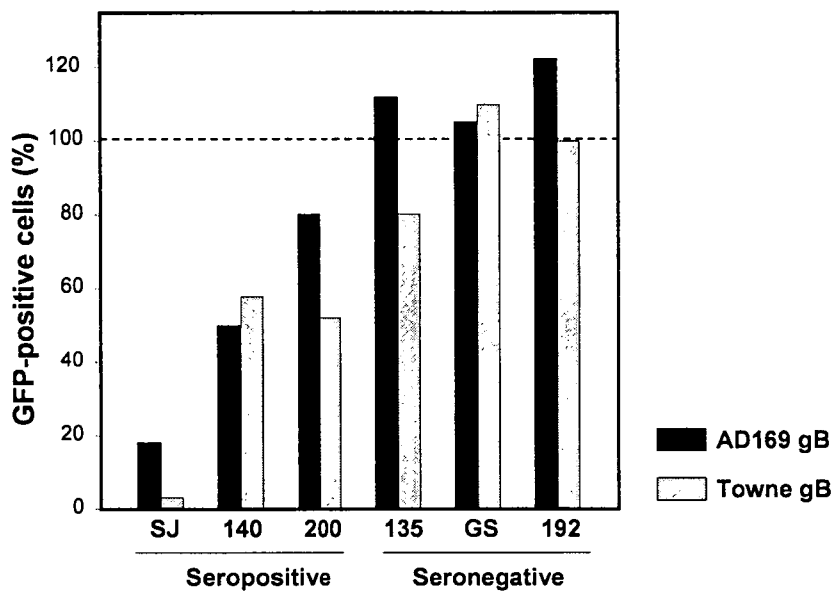


図4 感染後1ないし3週の間におけるGPCMVの分布

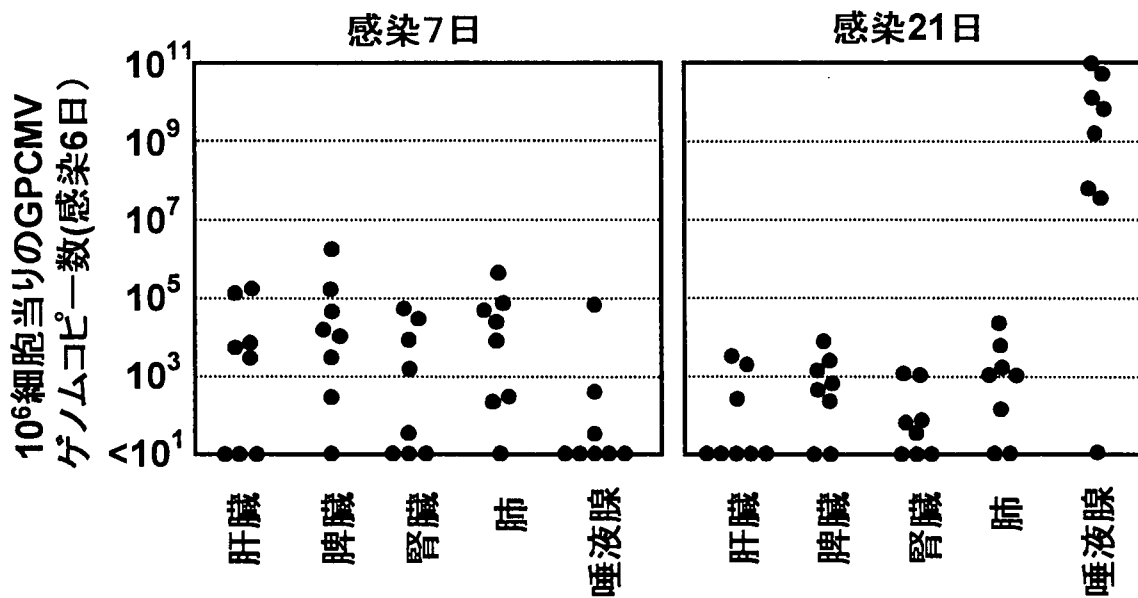


図5 GPCMVの他の宿主のCMVとの遺伝子構造の類似性

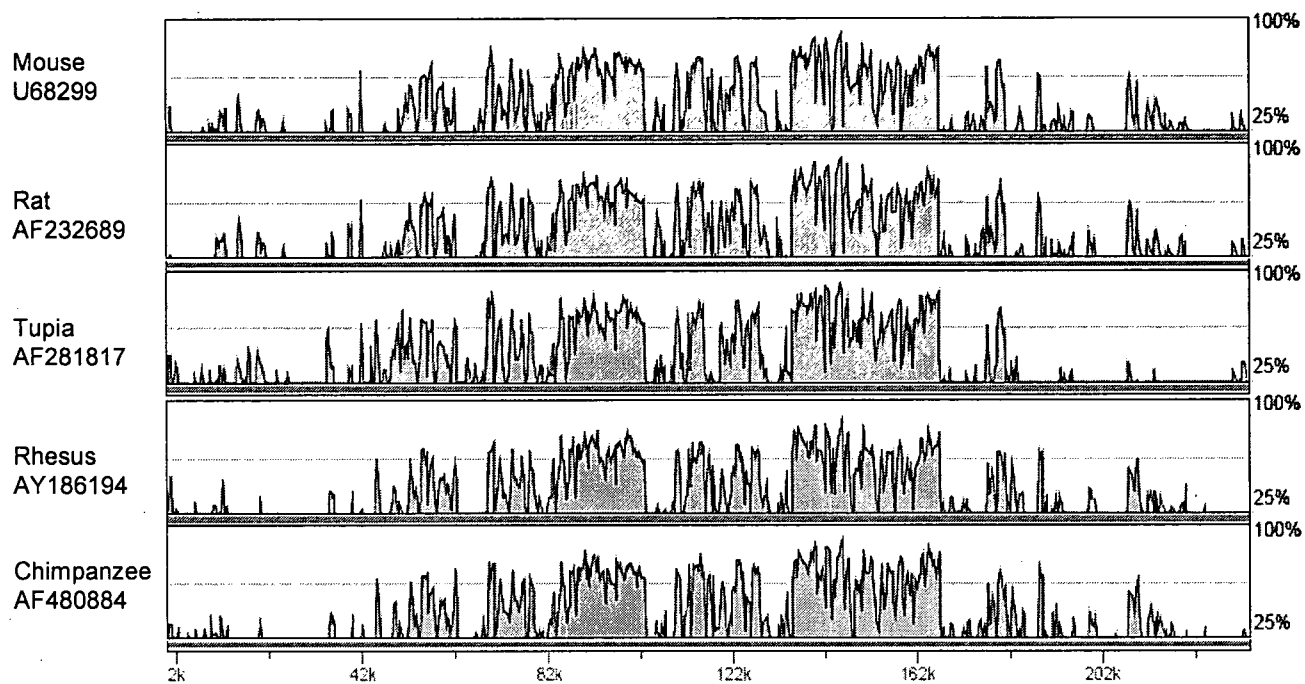
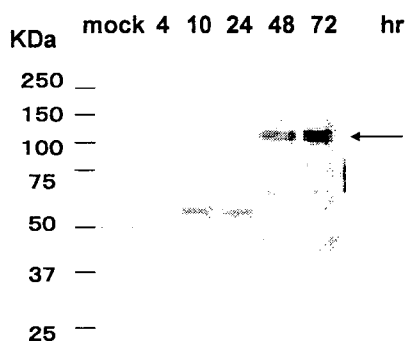


図6 作製した抗体を用いたGPCMV IE蛋白の検出



## 天然痘ワクチンの有効性を評価するための霊長類を用いたモデルの 作製

分担研究者：西條政幸（国立感染症研究所 ウイルス第一部 第一室）  
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 第二室）  
永田典代（国立感染症研究所 感染病理部 第二室）  
森川 茂（国立感染症研究所 ウイルス第一部 第一室）

研究要旨：近年、生物兵器のひとつとして痘瘡（いわゆる、天然痘）ウイルスが用いられるという危険性が指摘されている。1977年に天然痘が根絶された今日においても、天然痘ワクチンの必要性は低下することはない。安全で有効な天然痘ワクチンを開発するための基礎研究として、霊長類（カニクイザル）を用いた評価システムの開発を試みた。本研究で明らかにされた事項は、1)天然痘の病原ウイルスである痘瘡ウイルスに極めて近縁なウイルスで、霊長類において天然痘様疾患を引き起すサル痘ウイルスをチャレンジウイルスとすることで天然痘ワクチンの評価が可能なること、2)その評価系において用いるべきチャレンジウイルスにはコンゴ盆地型サル痘ウイルスを選択し、皮下接種経路で感染させること、3) ウイルス血症レベルを定量的に決定するための LightCycler-PCR 法および各種サイトカインレベルを測定する multiplex 法が、天然痘ワクチンの有用性を評価する方法として有用であること、等である。カニクイザルにサル痘ウイルス（Zr-599 株）を皮下接種する動物感染モデルでは、ワクチン非接種群では致死的な感染症を誘導するのに対して、既存の天然痘ワクチン（Lister 株）免疫群では完全にサル痘の発症を阻止することが明らかにされた。天然痘ワクチンの有効性を評価するための霊長類を用いた動物実験モデルが開発された。

### A. 研究目的

バイオテロリズムの危険性はかねてから指摘されていたが、2001年9月11日のニューヨーク市とワシントンDCでのテロ事件およびその後の炭疽菌によるバイオテロリズム事件で、現実のものになった。バイオテロリズムに用いられる病原体として、痘瘡ウイルスが用いられる危険性があるため、我が国では天然痘ワクチン LC16m8 株が再生産され、その危険性に備えている。天然痘予防に有効な、より安全なワクチン開発が望まれる。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、ワクチンとするなどの方法である。本

研究では、天然痘ワクチンの有効性を評価するための、サル痘ウイルスを霊長類に感染させサル痘を発症させる動物実験モデルを開発することを目的とした。その目的のために、病原性の高いサル痘ウイルスの選定（コンゴ盆地型サル痘ウイルス Zr-599 株と西アフリカ型 Liberia 株の霊長類における病原性の違い）、サル痘ウイルス血症レベルの決定法 [定量的 LightCycler (LC)-PCR 法] の開発、既存の天然痘ワクチン Lister 株や LC16m8 株接種群およびワクチン非接種群におけるサル痘発症予防効果を解析した。

### B. 研究方法



- 1) ウイルス. 国立感染症研究所に保存されているサル痘ウイルス Zr-599 株 (コンゴ盆地型) と Liberia 株 (西アフリカ型) を用いた. 天然痘ワクチンとして, ワクチニアウイルス Lister 株または LC16m8 株を用いた.
- 2) 霊長類. カニクイザル (*Macaca fuscicularis*) を用いた.
- 3) 感染実験.  $10^6$  plaque forming unit (pfu) のサル痘ウイルスを, 鼻腔内接種法または皮下接種法で感染させた. また, 痘瘡ワクチン接種はヒトの場合と同様に二股針を用いた多圧接種法によった. チャレンジウイルス接種後, 約 3 週間, 食餌摂取量, 飲水量, 体温, 体重, 臨床症状を観察した. また, 2-4 日おきに末梢血液を採取し, 各種ウイルス学的指標の解析に供した. 尚, カニクイザルを用いたサル痘ウイルスの感染実験は, 国立感染症研究所実験動物委員会の承認のもとに, 国立感染症研究所の高度安全研究施設内で行われた.
- 4) ウイルス分離および定量的 LC-PCR 法の開発. ウイルスゲノム血症レベルは, サル痘ウイルス ATI-遺伝子の特異配列を利用した定量的 LightCycler-PCR (qLC-PCR) 法によった. 感染性サル痘ウイルスは, 末梢血液 4ml から buffy coat 分画を採取し, その分画内に含まれる細胞成分を PBS で洗浄して Vero 細胞と共培養することにより分離した.
- 5) 血中サイトカイン濃度の測定: 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-1beta, IL-1Ralpha, IL-2, IL-2R, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12p40/p70, IL-13, IL-15, IL-17, TNF-alpha, IFN-alpha, IFN-gamma, GM-CSF, MIP-1alpha, MIP-1beta, 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 (multiplex 法) で測定した.

## C. 結果

- 1) サル痘ウイルス Zr-599 株 (コンゴ盆地型) と Liberia 株 (西アフリカ型) の霊長類における病原性. 10 頭のカニクイザルを用いた.  $10^6$  (pfu) のサル痘ウイルス Zr-599 株を, 3 頭に皮下接種経路 (Zr-599-SC 群) で, 2 頭に鼻腔内噴霧経路 (Zr-599-IN 群) で感染させた. また,  $10^6$  pfu の Liberia 株を 3 頭に (西アフリカ型) 皮下接種経路 (Liberia-SC 群) で, 残りの 2 頭に鼻腔内噴霧経路 (Liberia-IN 群) で感染させた. Zr-599-SC 群において, サル痘の症状が最も強く, ウイルス血症レベルも高く, そのレベルも高いまま死亡する (安楽殺される) まで維持された. Zr-599-SC 群の 3 頭すべて致死感染を呈した. 一方, Liberia-SC 群の 1 頭 (#4567) は, 敗血症および重症サル痘により感染 10 日後に安楽殺されたものの, Liberia-SC 群の残る 2 頭, および, Zr-599-IN 群, Liberia-IN 群のサルでは食欲の回復と体重の増加が認められ, 致死性サル痘を発症することはなかった. Zr-599 株が Liberia 株より高い病原性を呈することが明らかにされた. その高い病原性は, カニクイザルにおいて Zr-599 株が Liberia 株より, 内部臓器 (消化器系, リンパ組織系, 泌尿生殖器系臓器) により重度の病変を引き起こすことによると考えられた.
- 2) 天然痘ワクチン Lister 株接種のカニクイザルにおけるサル痘発症予防効果. 2 頭のカニクイザルには,  $10^6$  pfu の Liberia 株を皮下接種し (皮下接種非免疫サル群), 2 頭のカニクイザルには, 同量のウイルスを鼻腔内噴霧接種した (鼻腔内接種非免疫サル群). 残りの 2 頭には, はじめに二股針を用いて Lister 株ワクチンを右上腕に接種し, その 5 週間後に  $10^6$  pfu の Liberia 株を鼻腔内接種した (鼻腔内接種 Lister 免疫サル群). 鼻腔内接種非免疫サル群では, チャレンジ後 10 日目以降に 10-20 個の水疱性皮膚病変が大腿部, 臀部, 顔部, 背部に散見された. 同時に食欲の低下, 活動性の低下が認められた. ほ

ば 10%の体重減少が観察された。感染後 16 日頃から症状の改善が認められた。皮下接種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、徐々に潰瘍化してきた。1 頭では、全体で 30 個程の水疱性皮膚病が出現し、他の 1 頭では、500 を越える水疱性病変が出現し、チャレンジウイルス接種後 10 日目に死亡した。一方、鼻腔内接種 Lister 免疫サル群では、全くサル痘ウイルス感染によると考えられる症状は認められなかった。また、Zr-599 株をチャレンジウイルスとした実験でも同様の成績が得られた。

- 3) 血中各種サイトカインレベルの multiplex 法による解析。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  $10^6$  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 株天然痘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。IL-6, eotoxin, 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かった。しかし、免疫サル群でのこれらのサイトカインの上昇の程度は軽微なものであっても、サル痘発症前の感染 4 日後からその上昇が認められ、サル痘の発症に一致してサイトカインの上昇が認められる非免疫サル群とは異なる反応パターンを示した。IL-1beta, IL-10, IFN-alpha, IL-12, IL-13, IL-17, MIP-1alpha, 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。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。IFN-gamma は、非免疫サル群で

は変化がなく、免疫サル群で上昇する傾向を示した。

#### D. 考察

本研究においては、サル痘ウイルスを霊長類（カニクイザル）に感染させてサル痘を発症させる系を用いて天然痘ワクチンの効力を評価するシステムを開発した。コンゴ盆地型サル痘ウイルスが西アフリカ型サル痘ウイルスより霊長類において高い病原性を呈することが明らかにされたので、チャレンジウイルスにはコンゴ盆地型サル痘ウイルスを用いるべきであると考えられる。また、サル痘ウイルスを、より重症のサル痘を発症させる皮下接種経路で感染させることが、評価システムにおいては望ましいと考えられる。また、新規に開発されたワクチンの発症予防効果を解析するには、臨床症状だけでなく、末梢血中のウイルスゲノム血症レベルを qLC-PCR 法により測定すること、サル痘ウイルス感染後の末梢血中のサイトカイン反応の程度やパターンを multiplex 法により解析すること、等が有用であることが示された。

1977 年のソマリアにおける天然痘患者の自然発生例を最後に、天然痘患者は発生していない。1980 年には、世界保健機構が天然痘の根絶を宣言した。しかし、残念なことに、その根絶されたはずの天然痘の病原体である痘瘡ウイルスがバイオテロ病原体として使用される危険性が残されている。そのため、有効でかつ安全な天然痘ワクチンの開発が望まれる。現在、天然痘ワクチンとして生産・保管されているものは、ワクチニアウイルスと呼ばれる生ワクチンである。これらのワクチンの有効性は確立されているものの、重症副作用の出現頻度が比較的高いことが問題点として指摘されている。今後、新規ベクターを用いた新型ワクチンの開発とその有用性の評価には、本研究で開発された天然痘ワクチン評価システムが重要な役割をはたすことと考え

られる。

E. 結語

天然痘ワクチンの有効性を評価するための霊長類を用いた動物実験モデル、および、その評価方法を開発した。

F. 健康危険管理情報  
なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Saijo M, Tang Q, Shimayi B, Han L, Zhang Y, Asiguma M, Tianshu D, Maeda A, Kurane I, Morikawa S. Possible horizontal transmission of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus from a mother to her child. Japanese Journal of Infectious Diseases 57:55-57, 2004
- 2) Niikura M, Maeda A, Ikegami T, Saijo M, Kurane I, Morikawa S. Modification of endothelial cell functions by hantaan virus infection: prolonged hyper-permeability induced by TNF-alpha of hantaan virus infected endothelial cell monolayers. Archives of Virology 149. 1279-1292, 2004
- 3) Mizutani T, Fukushi S, Saijo M, Kurane I, Morikawa S. Phosphorylation of p38 MAPK and its downstream targets in SARS coronavirus-infected cells. Biochemical Biophysical Research Communication 319: 1228-1234, 2004
- 4) Mizutani T, Fukushi S, Saijo M, Kurane I, Morikawa S. Importance of Akt signaling pathway for apoptosis in SARS-CoV-infected Vero E6 cells. Virology 327: 169-174, 2004
- 5) Mizutani T, Fukushi S, Murakami M, Hirano T, Saijo M, Kurane I, Morikawa S. Tyrosine dephosphorylation of STAT3 in SARS coronavirus-infected Vero E6 cells. FEBS letter 5;577(1-2):187-192, 2004
- 6) Saijo M, Tang Q, Shimayi B, Han L, Zhang Y, Asiguma M, Tianshu D, Maeda A, Kurane I, Morikawa S. Recombinant nucleoprotein-based serological diagnosis of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus infections. Journal of Medical Virology 75:295-299, 2005
- 7) 西條政幸. サル痘ウイルス感染症. 臨床と微生物 31:21-24, 2004
- 8) 西條政幸. ウイルス性出血熱. 化学療法の領域 20:224-228,2004
- 9) 西條政幸, 森川茂, 倉根一郎. クリミア・コンゴ出血熱. ウイルス 54:223-228,2004
- 10) Saijo M, Morikawa S, Fukushi S, Mizutani T, Hasegawa H, Nagata N, Iwata N, Kurane. Inhibitory effect of mizoribine and ribavirin on the replication of severe acute respiratory syndrome (SARS)-associated coronavirus. Antiviral Research 66:159-163, 2005
- 11) 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
- 12) 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
- 13) 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
- 14) 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
- 15) 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
- 16) 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
- 17) 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
- 18) Saijo M, George-Courbot MC, Fukushi S, Mizutani T, Philippe M, Georges AJ, Kurane I, Morikawa S. Marburgvirus nucleoprotein-capture enzyme-linked immunosorbent assay using monoclonal antibodies to recombinant nucleoprotein detection of authentic Marburgvirus. *Japanese Journal of Infectious Diseases* 59:323-325, 2006
- 19) Saijo M, Ami Y, Suzaki Y, Nagata N, Iwata N, Hasegawa H, Ogata M, Fukushi S, Mizutani T, Sata T, Kurata T, Kurane I, Morikawa S. Highly attenuated vaccinia vaccine, LC16m8, lacking B5R membrane protein expression protects monkeys from monkeypox. *Journal of Virology* 80:5179-5188, 2006
- 20) Saijo M, Niikura M, Ikegami T, Kurane I, Kurata T, Morikawa S. Laboratory diagnostic systems for Ebola and Marburg hemorrhagic fevers developed with recombinant proteins. *Clinical and Vaccine Immunology* 13:437-443, 2006
- 21) Shirato K, Nishimura H, Saijo M, Okamoto M, Noda M, Tashiro M, Taguchi F. Diagnosis of human respiratory syncytial virus infections using reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP). *Journal of Virological Methods* 139:78-84, 2007

- 22) Mizutani T, Fukushi S, Ishii K, Sasaki Y, Kenri T, Saijo M, Kanaji Y, Shirato K, Kurane I, Morikawa S. Mechanism of establishment of persistent SARS-CoV-infected cells. *Biochemical and Biophysical Research Communication* 347:261-265, 2006
- 23) Fukushi S, Mizutani T, Saijo M, Kurane I, Morikawa S. Evaluation of a vesicular stomatitis virus pseudotype-based assay for detection of valuable for SARS-CoV neutralizing antibody responses to SARS-CoV. *Journal of Medical Virology* 78:1509-1512, 2006
- 24) Mizutani T, Fukushi S, Iizuka D, Inanami O, Kuwabara M, Takashima H, Yanagawa H, Saijo M, Kurane I, Morikawa S. Inhibition of cell proliferation by SARS-CoV infection in Vero E6 cells. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 46:236-243, 2006
- 25) Mizutani T, Fukushi S, Saijo M, Kurane I, Morikawa S. Regulation of p90RSK phosphorylation by SARS-CoV infection in Vero E6 cells. *FEBS Letter* 580:1417-1424, 2006
- 26) Ike F, Bourqade B, Sato H, Saijo M, Kurane I, Morikawa S, Yamada Y, Jaubert J, Berard M, Nakata H, Hiraiwa N, Mekada K, Takakura A, Itoh T, Obata Y, Yoshiki A, Montagutelli X. LCMV infection in a wild-derived mouse inbred strain undetected by dirty bedding sentinel health monitoring and revealed after embryo transfer. *Comparative Medicine* (in press)
- 27) Mizutani T, Fukushi S, Kenri T, Sasaki Y, Endoh D, Zamoto A, Saijo M, Kurane I, Morikawa S. Enhancement of cytotoxicity against Vero E6 cells persistently infected with SARS-CoV by *Mycoplasma fermentans*. *Archives of Virology* (in press)
2. 学会発表
- 1) Saijo M, Tang Q, Kurane I, Morikawa S. Molecular epidemiology of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus infections in the Xinjiang Uygur Autonomous Region, P. R. China. 5th Japan-China Virology Conference. June, 2004, Osaka
- 2) Saijo M. Crimean-Congo hemorrhagic fever in the Xinjiang Uygur Autonomous Region, P. R. China. Research activities towards the control of viral hemorrhagic fever (University of Hokkaido). June 2004, Sapporo
- 3) Niikura M, Maeda A, Ikegami T, Saijo M, Kurane I, Morikawa S. Modification of endothelial cell functions by Hantaan virus infection: prolonged heperpermiability induced by TNF-alpha of Hantaan virus-infected endothelial cell monolayers. International Conference on Hantavirus infections. June 2004, Seoul, South Korea
- 4) 西條政幸. 母親から感染したと考えられるクリミア・コンゴ出血熱の4歳女兒例. 第36回日本小児感染症学会, 2004年11月, 東京
- 5) 山田靖子, 水谷哲也, 高橋一朗, 福士秀悦, 西條政幸, 倉根一郎, 森川茂. SARS-CoVの継代培養による変異ウイルスの出現. 第52回日本ウイルス学会学術集会, 2004年11月, 横浜

- 6) 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. マウスとラットを用いた SARS-CoV 感染モデルの作製. 第 52 回日本ウイルス学会学術集会, 2004 年 11 月, 横浜
- 7) 西條政幸, 福士秀悦, 萩野利夫, 田口文広, 水谷哲也, 松山州徳, 倉根一郎, 田代真人, 森川茂. SARS コロナウイルスの組換え核蛋白を抗原とした ELISA 法の開発を評価. 第 52 回日本ウイルス学会学術集会, 2004 年 11 月, 横浜
- 8) 森川茂, 長谷川秀樹, 西條政幸, 前田秋彦, 倉根一郎, 尾崎泰子, 佐多徹太郎. 倉田毅, 小島朝人. ワクチニアウイルス LC16m8 株の有効性と遺伝子構造の解析. 第 52 回日本ウイルス学会学術集会, 2004 年 11 月, 横浜
- 9) 西條政幸, 網康至, 永田典代, 須崎百合子, 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 株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. 第 52 回日本ウイルス学会学術集会, 2004 年 11 月, 横浜
- 10) 福士秀悦, 水谷哲也, 西條政幸, 緒方もも子, 倉根一郎, 森川茂. ACE2 発現細胞を用いた SARS コロナウイルス感染の検討. 第 52 回日本ウイルス学会学術集会, 2004 年 11 月, 横浜
- 11) 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-CoV 感染細胞におけるアポトーシスに関するシグナル伝達系の網羅的検討. 第 52 回日本ウイルス学会学術集会, 2004 年 11 月, 横浜
- 12) 水谷哲也, 福士秀悦, 村上正晃, 西條政幸, 倉根一郎, 平野俊夫, 森川茂. SARS コロナウイルスの感染に誘導されるシグナル伝達の解析. 第 27 回日本分子生物学会年会. 2004 年 12 月, 神戸
- 13) 福士秀悦, 水谷哲也, 西條政幸, 倉根一郎, 西條政幸. Efficient replication of SARS coronavirus on the cells expressin mouse ACE2. 第 27 回日本分子生物学会年会. 2004 年 12 月, 神戸
- 14) Saijo M. Crimean-Congo hemorrhagic fever in the Xinjiang Uygur Autonomous Region, P. R. China. US-Japan Cooperative Medical Science Program. Joint Panels Symposium on Vector-Borne Infectious Diseases and Control. December 2004, Kyoto
- 15) 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
- 16) 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
- 17) 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
- 18) Saijo M, Ami Y, Nagata N, Hasegawa H, Fukushi S, Mizutani T, Iwata N, Suzuki 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
- 19) 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
- 20) 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
- 21) 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
- 22) 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
- 23) 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
- 24) 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
- 25) Saijo M, Georges-Courbot MC, Fukushi S, Mizutani T, Marianneau P, Georges AJ, Kurane I, Romanowski V, Morikawa S. Recombinant nucleoprotein-base diagnosis of Lassa fever-antibody and antigen detection systems. Filoviruses: Recent advances and future challenges, An ICID global conference, Winnipeg, Canada, September 2006
- 26) Saijo M, Ami Y, Suzuki Y, Nagata N, Iwata N, Hasegawa H, Ogata M, Fukushi S, Mizutani T, Sata T, Kurata T, Kurane I, Morikawa S. Highly attenuated vaccinia vaccine, LC18m8, lacking B5R membrane protein expression protects monkeys from monkeypox. 12th International Conference of Infectious Diseases, Lisbon, Portugal, June 2006
- 27) Yokote H, Shinmura Y, Satou A, Kanehara T, Ohkuma K, Oka T, Funatsu A, Morikawa S, Saijo M, Kurane I, Kurata T, Hashizume S. Safety and efficacy of attenuated

smallpox vaccine LC16m8 in animals.  
12th International Conference of  
Infectious Diseases, Lisbon, Portugal,  
June 2006

28) Yokote H, Shinmura Y, Kanehara T,  
Ohkuma K, Oka T, Funatsu A,  
Morikawa S, Saijo M, Kurane I, Kurata  
T, Hashizume S. Safety and efficacy  
study of attenuated smallpox vaccine  
LC16m8 in animals. ASM Biodefence  
Research Meeting, Washington DC,  
USA, February 2006

29) 西條政幸、網康至、須崎百合子、  
永田典代、岩田奈織子、長谷川秀樹、  
緒方もも子、福士秀悦、水谷哲也、  
倉根一郎、佐多徹太郎、倉田毅、森  
川茂. サル痘ウイルス Zr-599 株 (コ  
ンゴ盆地型) と Liberia 株 (西アフリ  
カ型) の霊長類における病原性. 第  
54 回日本ウイルス学会学術集会, 名  
古屋, 2006 年 11 月

30) 西條政幸、錫谷達夫、水田克巳、  
倉根一郎、森川茂. チミジンリン酸  
化酵素遺伝子の 1 番目と 45 番目の  
コドンに存在するメチオニンの間  
に終始コドンが存在する HSV-1 の  
薬剤感受性. 第 54 回日本ウイルス  
学会学術集会, 名古屋, 2006 年 1 月

H. 知的財産権の出願・登録状況  
なし



## 狂犬病ウイルスに対する骨髄系樹状細胞の反応

分担研究者：西園 晃（大分大学 医学部 感染分子病態制御講座）

協力研究者：後藤和代（大分大学 総合科学研究支援センター）

野口賀津子（大分大学 医学部 感染分子病態制御講座）

塩田星児（大分大学 医学部 感染分子病態制御講座）

研究要旨：狂犬病ウイルス街上毒株の感染は最終的に致死性病態を誘導するが、その際の中枢神経系における病理学的所見には形態的特徴、特に炎症反応などはほとんど認められず、中枢神経系においては免疫応答の抑制または不応答が引き起こされていると考えられている。それに対し、致死性病原性の減衰した弱毒株は、末梢において免疫を賦活し、それが故に致死性病態から免れていると考えられている。本研究では狂犬病ウイルス (RV) に対する樹状細胞の応答を検討することで、中枢神経系における病原性発現の端緒を末梢の免疫系細胞が担っている可能性について検討した。マウス樹状細胞由来 JAWSII 細胞は Challenge Virus Standard (CVS) または Evelyn Rotkitniki Abelseth strain (ERA) 接種により培養上清中に子孫ウイルスの産生は観察されなかった。CVS または ERA を接種した JAWSII 細胞の培養上清中の TNF- $\alpha$ 、IFN- $\alpha$  および IFN- $\beta$  を解析した結果、CVS と比較して ERA を接種した JAWSII 細胞の培養上清中には顕著に TNF- $\alpha$ 、IFN- $\alpha$  および IFN- $\beta$  が検出され、樹状細胞が末梢において暴露を受けた RV の株の違いにより自然免疫応答からひいては獲得免疫応答も左右されている可能性が推測された。

### A. 研究目的

狂犬病ウイルスは (RV) はラブドウイルス科リッサウイルス属に分類される一本鎖 RNA ウイルスである。RV は神経細胞に特に指向性が強く、ひとたび上向性に侵入し免疫特権領域である脳内に感染が拡大すれば、もはや獲得免疫応答をはじめ、いかなる手段をしても排除不可能であり、

宿主は死に至る。よって脳神経まで感染が及ぶか否かは、最初に暴露を受けた末梢組織での自然免疫応答に深く左右されており、暴露後ワクチン接種が効果を表す根拠もそこにあると考えられている。致死性病原性の減衰した RV 弱毒株の末梢における応答性と致死性病態を誘導する街上毒株とでは、末梢における免疫応答、

特に自然免疫応答と獲得免疫応答を繋ぐ樹状細胞の応答に根本的な違いがあることが予測される。

これまで、末梢局所に実験的に接種されたRV粒子の多くはマクロファージ等の貪食系の細胞内に存在することが報告されており、またマクロファージ由来のRAW264を用いた *in vitro* の実験において、RVはRAW264細胞に対して非感染性であり子孫ウイルスは産生しないが、ERK1/2シグナル経路を介してCXCL10の発現を誘導する事により、免疫系を活性化する事が報告されている。

これらの報告を元に本年度の研究では、末梢における自然免疫と獲得免疫を仲介するキーパーソンと考えられる樹状細胞を用いて、狂犬病ウイルス固定毒株と弱毒株をそれぞれ接種した場合の反応性の違いの解析を行った。

## B. 研究方法

### 1) 細胞

C57BL/6 マウス(H-2b)の骨髄より樹立された骨髄系樹状細胞株 JAWSII 細胞(ATCC CRL-11904)、およびマウス神経芽細胞腫由来細胞株 MNA を用いた。JAWSII 細胞の表面マーカーを FACScan にて解析したところ、CD11c, CD11b とともに強陽性で CD8 $\alpha$  は陰性であり、骨髄系樹状細胞に典型的な phenotype であった(図1)。

### 2) ウイルス

RV 固定毒株 Challenge Virus

Standard-11 (CVS)、および弱毒株 Evelyn Rotkitniki Abelseth (ERA) strain を用いた。ストックウイルスの調整および感染力価の測定には MNA 細胞を用い、Focus forming unit として算定した。

### 3) 樹状細胞への RV 接種

#### イ) JAWSII 細胞の形態的観察とウイルス特異抗原の観察

24 穴培養プレート 1 穴あたりに JAWSII 細胞を  $2.5 \times 10^5$  個播種した後に CVS または ERA を MOI=10、MOI=5、MOI=1 で接種した。6, 12, 24, 48, 72 時間後の感染細胞を顕微鏡下で観察を行った。さらに、これらの細胞をピペッティングにて回収し、PBS で洗浄した後スライドグラスに固着させ、アセトンで固定を行った。固定終了後、FITC 標識抗 RV-N モノクローナル抗体 (Centocor 社) を用いた直接蛍光抗体法により 40 分、37°C インキュベーター内で反応させ、蛍光顕微鏡にて観察を行った。

#### ロ) FACScan と共焦点レーザー顕微鏡による RV N と G 蛋白の樹状細胞内での確認

96 穴プレート 1 穴あたりに JAWSII 細胞を  $6.0 \times 10^4$  個播種した後に CVS または ERA を MOI=5 で接種した。48 時間後に細胞をピペッティングにて回収し、PBS で洗浄した後、イ) と同様に FITC 標識抗 RV-N モノクローナル抗体

(Centcor 社)と RV-G モノクローナル抗体(#4-12)を 40 分、37°C 反応させた後、FACSscan により蛍光強度の測定を行った。また同様に接種した細胞を上記と同じ 1 次抗体を用いて、共焦点レーザー顕微鏡 (Zeiss 社) にて観察した。

#### ハ) RV 特異的 mRNA の検出

6 穴プレート 1 穴あたりに JAWSII 細胞を  $2.5 \times 10^5$  個播種した後に CVS または ERA を MOI=5 で接種した。48, 72, 120 時間後に Isogen (和光純薬) にて回収し、総 RNA を抽出し、cDNA 合成用プライマーとしてウイルス特異配列検出用 N5R-660

(5' -GTTCGCTATAGTACTCC -3' )プライマーにより MMLV 逆転写酵素 (Gibco BRL) にて cDNA を合成、その後 10g (5' -CTACAATGGATGCCGAC -3' ) と N5R-660 にて PCR 反応を行い、アガロースゲルにて電気泳動、エチジウムブロミド染色を行った。内部標準対照として oligo(dT) をプライマーに用いて cDNA 合成後、GAPDH 遺伝子領域を PCR にて増幅し、同様に解析した。

#### ニ) JAWSII 培養上清中の子孫ウイルス産生量の測定

24 穴プレート 1 穴あたりに JAWSII 細胞を  $2.5 \times 10^5$  個播種した後に CVS または ERA を MOI=5 で接種した。6, 12, 24, 48, 72 時間後に培養上清液を回

収し感染性子孫ウイルス量を MNA 細胞を用いたフォーカス形成試験により測定した。

#### 4) ウイルス接種による JAWSII 細胞表面での抗原提示関連分子の発現の観察

CVS, ERA いずれも moi=5 で JAWSII 細胞に接種し、72 時間後に細胞を回収・固定し、FACSscan により細胞表面分子の解析を行った。FACSscan に用いた抗体は、MHC class I (Pharmingen clone 28-8-6), class II (Beckton Dickinson clone M5/114/15.2), CD40 (eBioScience clone 4B12), CCR7 (eBioScience clone 1C10) である。

#### 5) 樹状細胞培養上清中の TNF- $\alpha$ , IFN- $\alpha$ および IFN- $\beta$ 産生

24 穴プレート 1 穴あたりに JAWSII 細胞を  $2.5 \times 10^5$  個播種した後に CVS または ERA を MOI=10, MOI=5, MOI=1 で接種した。24, 72 時間後に培養上清液を回収し TNF- $\alpha$ , IFN- $\alpha$  および IFN- $\beta$  を ELISA (eBioScience 社) にて測定した。

### C. 研究結果

#### 1) 樹状細胞への RV 接種

##### イ) JAWSII 細胞の形態的観察とウイルス特異抗原の観察

CVS, ERA いずれを感染させた JAWSII 細胞も 6, 12, 24, 48 時間後では形態学的な変化、特に CPE は観察

されなかったが、ERA を接種した JAWSII 細胞は、72 時間後から細胞の樹状化が目立つようになり、120 時間後では対照と比べその差は明瞭となった (図 2)。

蛍光抗体染色法による観察では、CVS および ERA を接種した JAWSII 細胞では、RV N 蛋白を発現した細胞はほとんど観察されなかった。

ロ) FACScan と共焦点レーザー顕微鏡による RV N 蛋白の確認

図 3 は抗 RV N モノクローナル抗体を用いて染色された JAWSII 細胞の蛍光強度である。CVS を接種した JAWSII 細胞では蛍光強度の移動は観察されないが、ERA 感染 JAWSII 細胞では弱くはあるが N 蛋白の細胞内での発現が確認された。同様に共焦点レーザー顕微鏡を用いた観察では、ERA 接種 JAWSII 細胞で数視野に 1 ~ 2 個の陽性細胞が観察されたのみで、CVS 接種 JAWSII 細胞、非感染 JAWSII 細胞では蛍光は確認できなかった (図 4)。

ハ) RV 特異的転写物の検出

図 5 は RV 接種後 JAWSII 細胞内のウイルス特異的転写産物の経時的変化である。

ERA を接種された JAWSII 細胞では、ウイルス特異的 mRNA が経時的に検出されたが、CVS を接種した場合は JAWSII 細胞内でウイルスの増殖は起

こっていないことが示された。

ニ) JAWSII 培養上清中の子孫ウイルス産生量の測定

CVS および ERA を接種した JAWSII 細胞の培養上清中における感染性粒子量は、コントロール (JAWSII 細胞を含まずウイルスだけをインキュベートした場合) と比較して速やかに減衰し、培養上清中には子孫ウイルスの産生は認められなかった。(図 6)

2) ウイルス接種による JAWSII 細胞表面での抗原提示関連分子の発現の観察

図 7 に示すごとく MHC class I 分子は、ウイルス接種により発現の増強が認められた。ERA 接種での発現増強は CVS のそれより明らかに強かった。ERA 接種では MHC class II 分子の発現も増強していたが、CVS ではほとんど変化は無かった。CD40 と CCR7 はいずれのウイルスの接種においても JAWSII での発現の増強は認められなかった。

3) 樹状細胞培養上清中の TNF- $\alpha$ 、IFN- $\alpha$  および IFN- $\beta$  産生

ERA を接種した JAWSII 細胞では、24 時間、72 時間後のいずれでも非常に高い TNF- $\alpha$  産生が培養上清中で認められ、これは moi 依存性であった。一方、CVS 接種の場合は対照と比べると TNF- $\alpha$  の産生は確認されたが、そ