

and Characterization of Carbohydrate Molecules in Mammalian Cells Recognized by Dengue Virus Type 2. *Journal of Biochemistry*, Vol.139, 607-614, 2006

Parida, M. M., Santhosh, S. R., Dash, P. K., Tripathi, Saxena, N. K., Ambuj, P. S., Sahni, A. K., Rao, P. V. Lakshmana, and Morita, K. Development and Evaluation of Reverse Transcription-Loop-Mediated Isothermal Amplification Assay for Rapid and Real-Time Detection of Japanese Encephalitis Virus. *J. Clin. Microbiol.* Vol. 44: 4172-4178, November 2006

森田 公一：「西ナイルウイルスの現状と問題点」、成人病と生活習慣病 Vol.36(8), 910-913, 2006

森田公一：「アジアにおける日本脳炎疫学状況」、小児科 Vol147, 296-302, 2006.

森田公一：「西ナイルウイルスとワクチン開発」、感染症免疫、Vol36(3) 242-244, 2006

長谷部太、森田公一：「デングウイルス研究の最前線」、医学のあゆみ Vol 218, 845-848, 2006.

2) 学会発表

国際会議における発表

Morita K. Japanese encephalitis virus ecology in Asia Implies possible rapid region-wide West Nile virus expansion: Needs of Development of West Nile fever vaccines. Scientific Conference of the Pasteur Institute International Network on Emerging and Re-emerging Viral Infections. (Nanoi, Vietnam, November 27-28, 2006)

Morita K. Studies on anti-dengue compounds that inhibit cell entry. International Symposium on Dengue. (Pune, India, November 10, 2006)

国内会議における発表

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学術集会・愛知県名古屋市、2006年11月19-21日

Parida Manmohan、森田公一：DEVELOPMENT AND EVALUATION OF REVERSE TRANSCRIPTION LOOP MEDIATED ISOTHERMAL AMPLIFICATION ASSAY FOR JAPANESE ENCEPHALITIS VIRUS. 第54回日本ウイルス学会学術集会・愛知県名古屋市、2006年11月19-21日

井上真吾、長谷部 太、森田公一：デングウイルス感染症における一次感染および二次感染診断法の開発. 第54回日本ウイルス学会学術集会・愛知県名古屋市、2006年11月19-21日

H. 知的財産権の出願・登録状況

ウエストナイルウイルス生ワクチン開発に関する特許を申請中である。

厚生科学研究費補助金
(厚生労働省 研究事業)

分担研究報告書

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

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）

米国で流行しているウエストナイルウイルスは蚊によって媒介される節足動物媒介性ウイルスである。ウエストナイルウイルスは、カラスやカケスなどの野鳥と蚊の間で感染環が成立しており、本邦に侵入した場合も日本脳炎と異なり、都会でも大流行する可能性が高い。また2005年には我が国においても米国渡航者による輸入症例が報告された。ウエストナイル脳炎はひとたび発症するとその致死率は高く、回復しても重度の後遺症を伴う場合がある。またその治療法は確立されていないことからワクチン開発が急務である。ところで日本脳炎ウイルスの流行地域である日本を含む東アジアではこれまでに日本脳炎ワクチン(JE VAX)が広く普及しており、ウエストナイルワクチン(WN VAX)を導入するにあたりJE VAXとWN VAXの相互作用を検討することが求められる。そこで本研究において日本脳炎ウイルスに対する基礎免疫を付与したマウスのWN VAXに対する免疫応答の検討を行った。JE VAXにより基礎免疫を与えたマウスにWN VAXの追加免疫を行ったところ抗WNV中和抗体のみならず、抗JEV中和抗体に対するブースター効果が観察された。したがってWN VAXはこれまでのJE VAXと干渉することはなく、日本脳炎ウイルスに対する基礎免疫を持つ個体に対してもWNV対策として有効であることが示唆された。

A.研究目的

近年蚊によって媒介される感染症が世界的規模で大きな問題となっている。なかでも1999年にニューヨークで発生したウエストナイル熱/脳炎は北アメリカ大陸およびカリブ海地域のほぼ全域に拡大し現在もその流行が終息する気配はない。我が国においても米国渡航者による輸入症例が2005年に報告され、いっそうの警戒が必要になっている。ウエストナイルウイルスは日本脳炎ウイルス等とともにフラビウイルス科フラビウ

ルス属に分類される一本鎖の(+)RNAウイルスである。本感染症はトリを宿主とし蚊の吸血によってヒト、ウマ等に媒介されるウイルス性急性熱性疾患である。ウエストナイルウイルス感染者の約80%は症状を示さないが、特に高齢者において脳炎を発症することがある。現在ウマ用ウエストナイル不活化ワクチンおよびDNAワクチンが米国で認可されているがヒト用ワクチンはない。したがってヒト用ウエストナイルワクチンの開発が急務

である．ところで日本脳炎の流行地域である日本を含む東アジアではこれまでに日本脳炎ワクチン(JE VAX)が広く普及しており，日本脳炎対策として効果をあげている．したがって日本脳炎ウイルスと同じフラビウイルスに分類されるウエストナイルワクチン(WN VAX)を導入するにあたっては JE VAX と WN VAX の相互作用を検討することが求められる．そこで本研究においてJEVに対する基礎免疫を付与したマウスの WN VAX に対する免疫応答の検討を行った．

B. 研究方法

ウイルスと培養細胞：ウエストナイルウイルス中和試験においてはウエストナイルウイルスNY99-6922株を日本脳炎ウイルス中和試験においては日本脳炎ウイルス Beijing-1株を用いた．ウイルス中和試験にはサル腎由来のVero細胞を用いた (American Type Culture Collection) ．

マウス：ウエストナイルワクチンあるいは日本脳炎ワクチン免疫マウスとして 4 週齢 C3H/He マウス (体重 10-12 g) (チャールス・リバー) を用いた．コントロール群においても同様のマウスを用いた．

ウイルス中和試験：ウイルス中和試験はVero細胞を用いた50%フォーカス減少法にて検討した．得られたマウス抗血清を10倍階段希釈し，ウイルスと等量混合後37°C1時間反応した．各血清-ウイルス反応液を96穴プレートに1ウェルあたり 2×10^4 個のVero細胞に接種し，37°Cで90分吸着後10%FCS-MEMを加え37°Cにて培養した．エタノールにて固定後PAP法にて感染細胞を染色しウイルス中和抗体価を算出した(図1)．

C. 研究結果

ウエストナイル及び日本脳炎ワクチン免疫マウスの中和抗体価の誘導：マウス脳由来日本脳炎不活化ワクチン (JE VAX) を 4 週齢の C3H/He マウス (♀) に免疫し，免疫 8 週後に組織培養由来ウエストナイル不活化ワクチン (WN VAX) を免疫した (JE/WN 群) ．初回免疫 0, 2, 4, 8, 9, 10, 11, 12, 14, 16 週後に各個体から採血を行い血清を分離し，各血清中の抗 JE, 抗 WN 中和抗体価を比較検討した．コントロール群として JE/PBS 群および PBS/WN 群を用意した．

その結果初回免疫 8 週後には JE VAX 免疫群において75%が20倍以上の抗JE中和抗体を有し，15%が抗WN中和抗体を有した．PBS接種群ではいずれのマウスも中和抗体保有率が0%であった．初回免疫16週後にはJE-WN群において抗JEVおよび抗WNV中和抗体保有率が共に100%であったのに対してJE-PBS群では抗JEV中和抗体保有率が55.6%，抗WNV中和抗体保有率が0%であった．またPBS-WN群では抗JEV中和抗体保有率が10%，抗WNV中和抗体保有率が80%であった(図2)．

D. 考察

マウスを用いた免疫実験の結果，JE VAX あるいはWN VAXを単独で1度免疫した場合，それぞれのウイルスに対して100%の中和抗体の上昇は認められなかった．しかしながらJE VAXにより基礎免疫を与えた個体にWN VAXの追加免疫を与えた場合は抗ウエストナイル中和抗体のみならず，抗日本脳炎中和抗体に対するブースター効果も観察された．したがってWN VAXはこれまでのJE VAXと干渉することはなく，日本脳炎ウイルスに対する基

礎免疫を持つ個体に対してもウエストナイルウイルス対策として有効であることが示唆された。

E. 結 論

本実験において Vero 細胞由来ウエストナイル不活化ワクチンはこれまでに東アジアに広く普及している JE VAX と干渉することなく、日本脳炎ウイルスに対する基礎免疫を持つ個体に対してもウエストナイルウイルス対策として有効であることが示唆された。米国において 1999 年初めて確認されたアメリカ大陸でのウエストナイルウイルスの活動は北中米のほぼ全域から南米に至るまで拡大している。米国では 2006 年も 4256 人の患者が報告され、ウエストナイルウイルスは今後も北アメリカに常在すると米国 CDC は予測している。さらに 2005 年には我が国において輸入症例も報告された。またロシアにおける患者の発生地域も東進しており、ウエストナイルウイルスの活動地域はウラジオストックに達している。ウエストナイルウイルスの動向には鳥、蚊、気候、環境等の要因が複雑に関わり、その状況の予測は困難であるためウエストナイルウイルスの我が国への侵入は予断を許さない。ウエストナイル脳炎はひとたび発症するとその致死率が高く、回復しても重度の後遺症を伴う場合が多いためワクチンの開発が急がれる。

F. 健康危険情報

な し

G. 研究発表

1. 論文

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

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., Fukushi, 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)

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

濱野正敬, 林 昌宏, 高木弘隆, 澤邊京子, 桑山 勝, 岸 昇, 高崎智彦, 倉根一郎. 広島県内の野生イノシシにおける日本脳炎ウイルスに対する抗体保有状況. 第141回日本獣医学会学術集会(つくば市) 2006/3/18-20

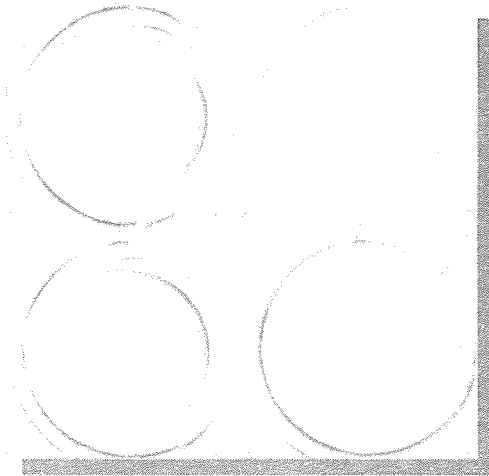
原田文植, 高崎智彦, 高木弘隆, 林 昌宏, 伊藤美佳子, 倉根一郎: 日本人デング熱患者における抗ウエストナイルウイルス交差中和抗体に関する検討, 第80回日本感染症学会2006年4月

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

A.



B.

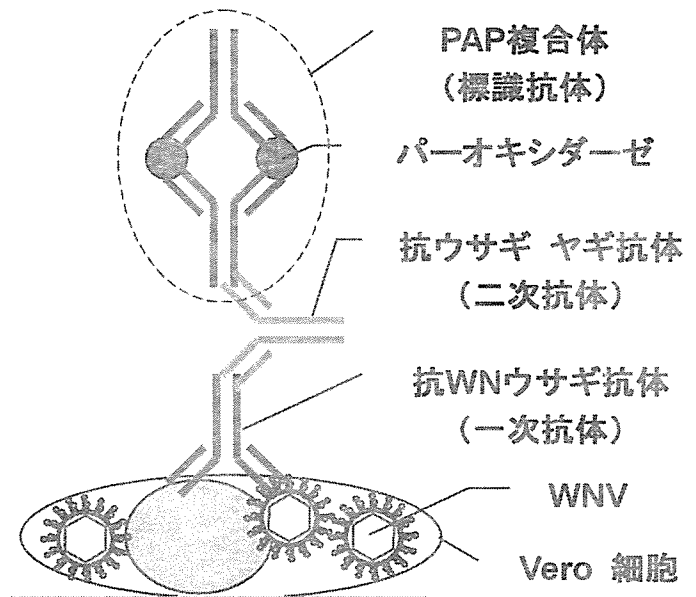
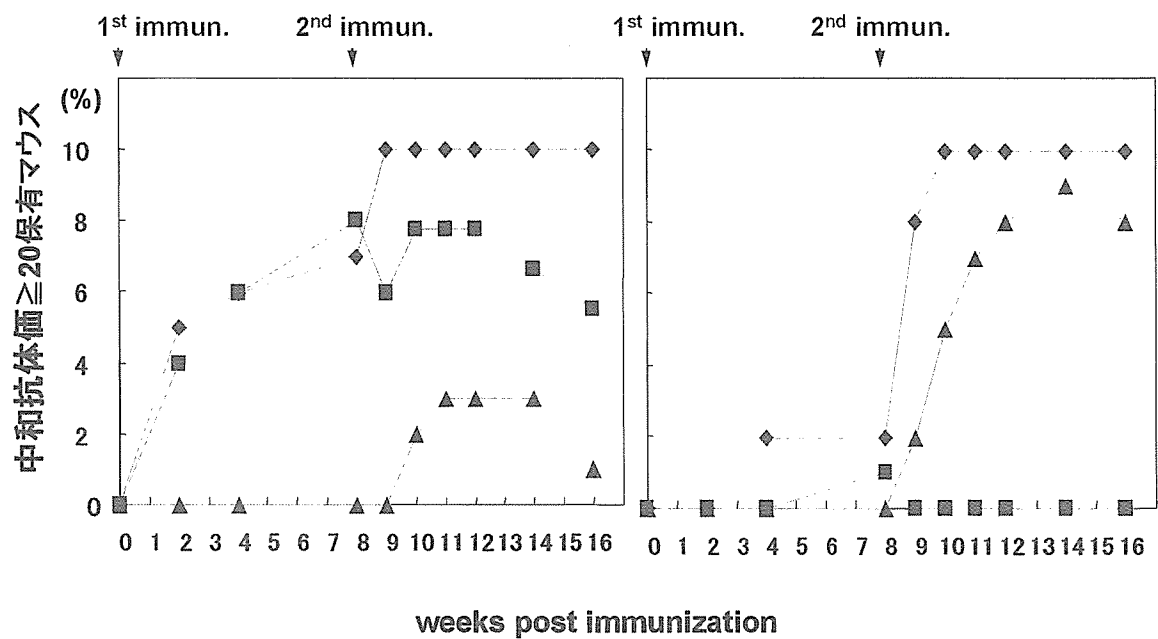


図1. **PAP(パーオキシダーゼ抗パーオキシダーゼ)法の原理**: A. PAP法により得られたフォーカスを示す. B. PAP法のメカニズムを示す. PAP法は一次抗体と標識抗体であるPAP複合体を二次抗体で架橋することにより目的抗原を検出する免疫染色法である.



A. 抗 JE 中和抗体価の経時的変化 B. 抗 WN 中和抗体価の経時的変化

図2. 抗日本脳炎ウイルスおよび抗ウエストナイルウイルス中和抗体価 ≥ 20 を示した各群のマウスの割合の経時的変化: 各中和抗体価 ≥ 20 を示した各群のマウスの割合の経時的変化を示す. \diamond は JE/WN 群 \blacksquare は JE/PBS 群 \blacktriangle PBS/WN 群である. (A) 抗日本脳炎中和抗体価 ≥ 20 を示した個体の割合の変化, (B) 抗ウエストナイル中和抗体価 ≥ 20 を示した個体の割合の変化を示す.

厚生労働科学研究費補助金（新興再興感染症研究事業）
分担研究報告書

遺伝子組換えを用いたウエストナイルウイルスサブユニットワクチンの開発

分担研究者	小島朝人	国立感染症研究所	感染病理部
研究協力者	高橋秀宗	国立感染症研究所	感染病理部
	田中恵子	国立感染症研究所	感染病理部
	田中道子	国立感染症研究所	感染病理部
	前田才恵	国立感染症研究所	感染病理部

研究要旨：ウエストナイルウイルス（WNV）ワクチン開発のために、中和抗体を誘導するウイルス様粒子（VLP）産生細胞の樹立を目的とした。昨年度は、WNV prM の上流に配置するシグナルシーケンスについて、粒子産生の効率化という観点から解析した。本年度は粒子形態と中和エпитープについて調べた。

その結果、最も VLP 産生効率の高いシグナルシーケンスから得られた WNV VLP は、平衡蔗糖密度勾配遠心法で比重=1.16 及び 1.11 の画分に二相性ピークを示すことが判明した。それぞれのピークにある VLP は形態上異なっているが、強い中和活性を有するモノクローナル抗体を使用した ELISA において同様に反応し、中和エпитープを有すると考えられた。さらに、濃縮した VLP を BALB/c マウスに免疫した血清は中和活性を示した。以上より、VLP 抗原産生細胞株を樹立し、ウイルスチャレンジ実験を行う基盤を確立できたと考えられた。

A. 研究目的

ウエストナイルウイルス（WNV）ワクチン抗原開発のために、中和抗体を誘導するウイルス様粒子（VLP）抗原産生細胞作製を目的とした。昨年度の結果から WNV prM の上流に配置するシグナルシーケンスについて、粒子抗原産生の効率的な切断端が判明したため本年度は粒子形態と中和エпитープについて調べた。

B. 研究方法

VLP の形態観察：

- (ア) 効率よく prM-E 抗原を産生させるプラスミド#12 を 293T 細胞へ導入した。
- (イ) 上清をセントリプレップ YM100 で濃縮し、SW41 ローターを用いた 20-60% 平衡蔗糖密度勾配法によってフラクシ

ンに分けた。

- (ウ) フラクシオン中の E 蛋白を 402 抗体を用い、ELISA によって定量した（図 1）。
- (エ) 二つのピークフラクシオンをそれぞれ濃縮し、ネガティブ染色後、電子顕微鏡によって観察した（図 2）。

モノクローナル抗体 WNY11 の中和活性：

- (ア) E 蛋白に対するモノクローナル抗体 WNY11 由来の腹水希釈系列（25000, 50000, 100000, 200000 倍）を作成した。
- (イ) ウエストナイルウイルス（NY99, 400 pfu/mL）を調整した。
- (ウ) 37°C、90 min 反応させ（200 pfu/mL）、Vero E6 へ感染させた。
- (エ) 3 日後、プラークを観察した。

WNY11 抗体による ELISA：

- (ア) prM-E 抗原を含む上清を 20-60% 平衡蔗

糖密度勾配法によって分画した。

- (イ) キャプチャー抗体として WNY11、検出抗体として HRP でラベルした WNY11 を用いて ELISA を行った (図 3)。

中和抗体誘導能 (プラークアッセイ) の解析:

- (ア) 濃縮 VLP を 3 匹の BALB/c マウスに免疫した。
(イ) 非免疫マウスを含め血清の希釈系列 (80, 320, 1280 倍) を作成した。
(ウ) ウエストナイルウイルス (NY99, 400 pfu/mL) を調整した。
(エ) 37°C、90 min 反応させ (200 pfu/mL)、Vero E6 へ感染させた。
(オ) 3 日後、プラークを観察した。

(倫理面への配慮)

本研究では特に臨床試料等を使用していない。動物実験は機関内実験指針に沿って行っている。

C. 研究結果

- (ア) Pr-E 発現プラスミドを 293T 細胞へ導入し、上清中の E 蛋白を定量したところ、平衡蔗糖密度勾配遠心上、二つのピークがあることが判明した (図 1)。
(イ) ピークフラクションをそれぞれ濃縮しネガティブ染色した。電子顕微鏡によって観察したところ、比重 1.11 のフラクションには球体状の直径約 25 nm の構造体を認めた (図 2)。比重 1.16 には直径 20 nm 程度につぶれた球体の集積像が認められた。
(ウ) モノクロナール抗体 WNY11 の腹水は 20 万倍希釈を行っても WNV によるプラーク形成を 78% 減少させることができた。
(エ) WNY11 による平衡蔗糖密度勾配のフラクション ELISA でも中和活性のない 402 抗体と同様、二相性のピークを認めた (図 3)。

- (オ) VLP の免疫後血清は 80 倍希釈で 50% 以上のプラーク形成阻害を示す、中和活性が認められた。

D. 考察

効率の良いシグナルシーケンスによって産生された WNV VLP は、平衡蔗糖密度勾配遠心法で比重=1.16 及び 1.11 の画分に形態上、異なる二相性ピークを示すことが判明した。形態から推測すると 1.16 の集積像は 1.11 の VLP によるものであると考えられた。

E 抗原に対するモノクロナール抗体 WNY11 の腹水の中和活性は非常に強いことが判明した。

WNY11 を用いた ELISA によっても同じ比重での二相性ピークを示したため、それぞれの VLP が中和活性誘導能を有すると考えられた。

さらに、濃縮した VLP を BALB/c マウスに免疫した血清は中和活性を示したことから、VLP 抗原産生細胞株を樹立し、ウイルスチャレンジ実験を行う基盤を確立できたと考えられた。

E. 結論

VLP の粒子形態と中和エピトープについて調べた結果、平衡蔗糖密度勾配遠心法で比重=1.16 及び 1.11 の画分に形態的に異なる二相性のピークを示すことが判明した。また VLP 産生細胞の上清分画は、強い中和活性を有するモノクロナール抗体を使用した ELISA においても二相性ピークを示し、それぞれ中和エピトープを有すると考えられた。さらに、濃縮した VLP を BALB/c マウスに免疫した血清は中和活性を示したため、VLP 抗原産生細胞株を樹立し、ウイルスチャレンジ実験を行う基盤を確立できたと考えられた。

F. 健康危険情報

該当事項なし

G. 研究発表

1. 論文発表

該当事項なし

2. 学会発表

ウエストナイルウイルスサブユニットワ
クチンの開発 高橋秀宗、前田才恵、田
中道子、佐多徹太郎、小島朝人、
第54回 日本ウイルス学会 名古屋

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 該当事項なし

2. 実用新案特許 該当事項なし

3. その他 該当事項なし

図1 prM-E 抗原産生 293T 細胞の上清を平衡蔗糖密度勾配法にて分画。抗E抗体 402 によって ELISA を行った。

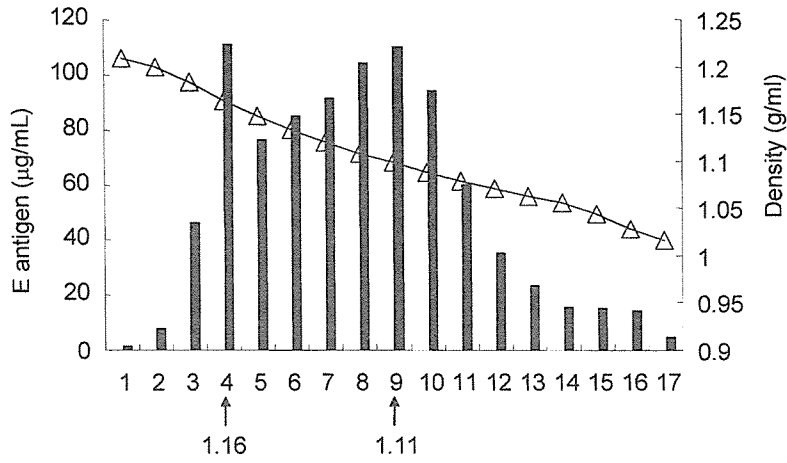


図2 平衡蔗糖密度勾配法において比重 1.16 と 1.11 を示すフラクションのネガティブ染色電顕像

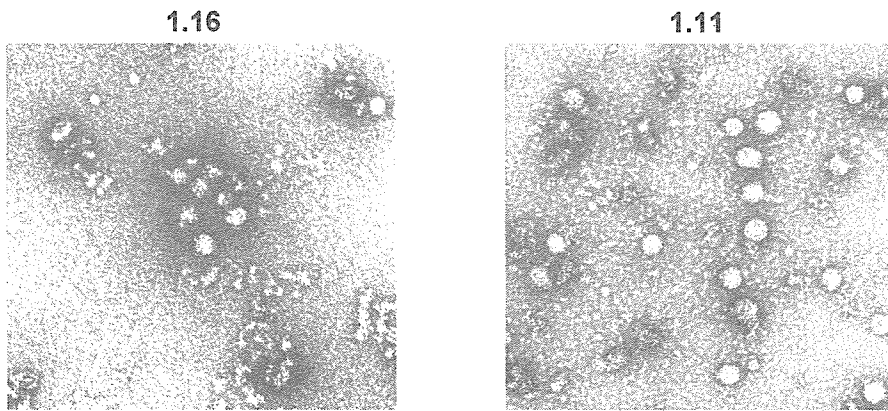
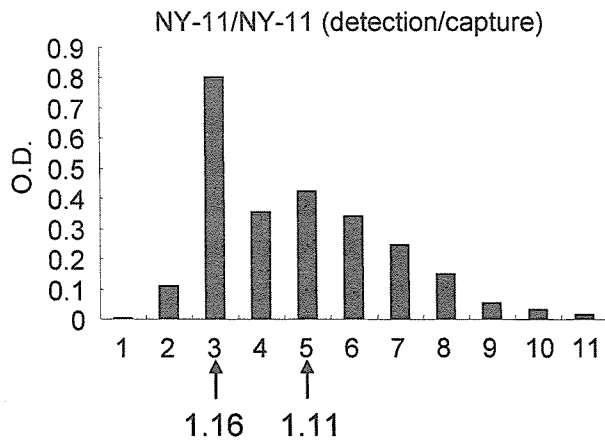


図3 prM-E 抗原産生 293T 細胞の上清を平衡蔗糖密度勾配法にて分画。中和活性を有する NY11 によって ELISA を行った。



厚生労働科学研究費補助金（ 新興・再興感染症研究事業 ）

分担研究報告書

日本脳炎ウイルス virus like particle (VLP) のワクチン効果の検討

—アジュバント併用投与効果の検討—

分担研究者 森 康子（医薬基盤研究所・感染制御プロジェクト）

研究協力者 岡本成史、吉井洋紀（医薬基盤研究所・感染制御プロジェクト）

赤木隆美、明石 満（大阪大学大学院工学研究科・応用化学専攻）

小島朝人（国立感染症研究所）

研究要旨

日本脳炎ウイルスに対する新しいワクチン候補として期待されている中空粒子（VLP）を用いた新規ワクチンの効果および、アルムアジュバントとの併用投与による同ワクチンの感染防御効果の是非について検討した。腹腔内への2回接種後でのVLP免疫マウスの血清中に中和抗体が検出されたが、その抗体価は現行の不活化ワクチン投与に比較し低値を示した。ところがVLPにアジュバントとして水酸化アルミニウムゲルあるいは γ -ポリグルタミン酸ナノ粒子（ γ PGA-NP）を併用することによって中和抗体価の増強がみられた。上記を免疫したマウスを用いてウイルス攻撃試験を行った結果、ワクチン非投与群では20%の生存率であったが、VLP 1 μ gの2回投与群ではアジュバントの有無に関わらず100%の生存率を示した。しかし、VLP 1 μ gの1回投与群では、マウスが8匹中3匹しか生存しなかった。対して、VLPと水酸化アルミニウムを混合投与した群では8匹中7匹、VLPと γ PGA-NP混合投与群では9匹中8匹が生存した。本結果より、VLPとアジュバントの混合投与がより効果的である可能性が示唆された。

A. 研究目的

日本脳炎（JE）不活化ワクチンの製造には製造過程でJEウイルスの大量培養を行う必要があり、安全上の問題があげられる。最近、小島らが日本脳炎ウイルス virus like particle (VLP) を作成し、同粒子のワクチン効果としての有効性を

報告している。VLPは、製造過程、病原体取り扱いレベル、作業コストの低減などの観点より考慮すると望まれるべき開発法である。そこで、現行の不活化ワクチンと比較した場合のワクチン効果の有効性およびアジュバント併用投与によるVLPのワクチン効果の増強の有無などに

ついて検討を行った。

B. 研究方法

1. 材料

現行の日本脳炎ワクチンである不活化日本脳炎ワクチン原液（北京株由来）、VLP（ホルマリン固定処理済）、ウイルス攻撃試験用の日本脳炎ウイルス（JaTH 160 株）、水酸化アルミニウムゲルは（財）阪大微生物病研究会観音寺研究所から供与された。 γ -ポリグルタミン酸ナノ粒子（ γ PGA-NP）は、大阪大学大学院工学研究科で作製された。

2. 接種方法

BALB/c マウス（雌、4 週齢）に現行の日本脳炎（JE）ワクチン（1 μ g, 0.3 μ g, 0.1 μ g）、VLP（1 μ g, 0.3 μ g, 0.1 μ g）を水酸化アルミニウムゲル（100 μ g）あるいは γ PGA-NP（100 μ g）混合投与群、非混合投与群にわけ、7 日間隔で 2 回あるいは 1 回腹腔内投与を行った。2 回投与群の場合は初回投与から 15 日後、1 回投与の場合では投与から 10 日後に、各々のマウスから採血後、血清を分離し、非働化処理を行った。本血清中における JE ウイルス（北京株）に対する中和抗体価を測定した。

3. ウイルス攻撃試験

2. に記した方法に準じてワクチン投与を行い、2 回投与の場合は初回投与から 15 日後、1 回投与の場合は投与 10 日後に、

JE ウイルス JaTH160 株（mouse LD₅₀=10⁴ pfu）を 3 x 10⁵ pfu を腹腔内接種した。そして接種後のマウスの生存率の変化を観察した。

（倫理面への配慮）

動物実験は医薬基盤研究所動物実験委員会の審査後に承認を受けて行われた。

C. 研究結果

1. VLP 単独投与および各種アジュバントとの併用投与による中和抗体価の比較

ワクチン 2 回投与においては、VLP 単独投与群では、現行の JE ワクチン投与群と比較して低い中和抗体価を示した（図 1）。一方 VLP に水酸化アルミニウムゲルを併用投与した群では中和抗体価の上昇がみられ、不活化ワクチン投与群の中和抗体価と同等かそれ以上の値を示した。一方、 γ PGA-NP との併用投与群においても中和抗体価の上昇が認められた。

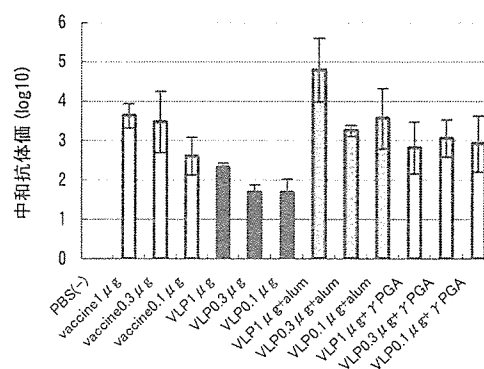


図 1 VLP 単独投与および VLP と各種アジュバントとの併用投与によるマウス血清中の中和抗体価の比較 マウスに 1 週間間隔で 2 回腹腔内投与し、最終投与から 7 日後の血清中の中和抗体価を測定した。alum; 水酸化アルミニウムゲル、 γ PGA; γ PGA-NP。

2. VLP のワクチン効果

上記方法で免疫を施行したマウスに致死

量の JE ウイルスを接種し、マウス生存率について検討した。その結果、VLP (各 1 もしくは 0.1 μg) を 2 回投与した場合は、VLP 0.1 μg 単独投与群を除いて、アジュバントの有無に関わらず 100% の生存率を示した。

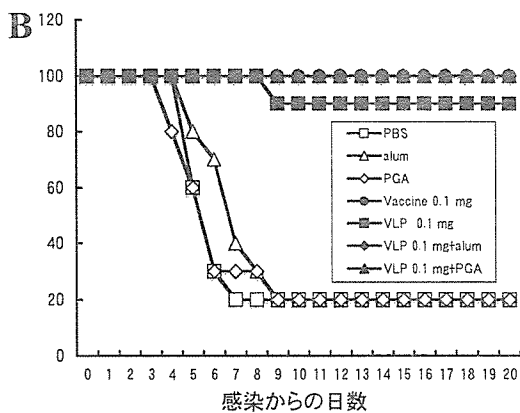
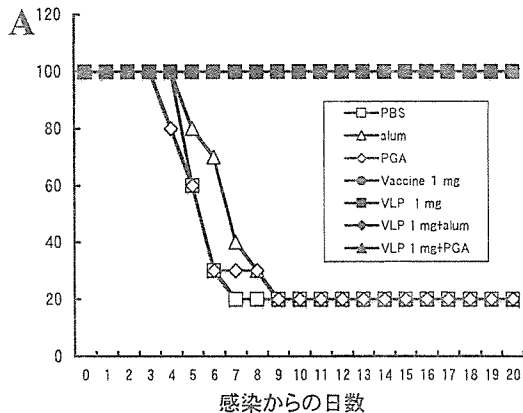


図2 VLP 2 回免疫マウスでの日本脳炎ウイルス接種における防御効果 A: ワクチンおよび VLP 1 μg 投与 B: ワクチンおよび VLP 0.1 μg 投与でのマウス生存率の経時的变化。alum;水酸化アルミニウムゲル, PGA; γ PGA-NP. Vaccine; 現行の日本脳炎ワクチン。一群あたりのマウス数は 10 匹である。

また VLP 0.1 μg 単独投与群においても生存率は 90% と非常に高い値を示したが、ワクチン非投与群では、20% の生存率であった (図 2)。

VLP 単独での 2 回免疫で高い防御効果を得られたことから、VLP 1 回免疫での防御効果の是非について検討した。しかし、VLP 単独投与群での生存率は、37.5% (供試マウス 8 匹に対して 3 匹生存) にとどまった (図 3)。一方、VLP に水酸化アルミニウムゲルないし γ PGA-NP を併用投与したところ、生存率が 80% 以上 (水酸化アルミニウムゲル併用群で供試マウス 8 匹に対して 7 匹生存、 γ PGA-NP を併用群で供試マウス 9 匹に対して 8 匹生存) と防御効果の増強を示した (図 3)。しかし、この実験系は 2 回の実験で得られたものにとどまらず、今後もこの傾向であるか慎重に再検討していく必要がある。

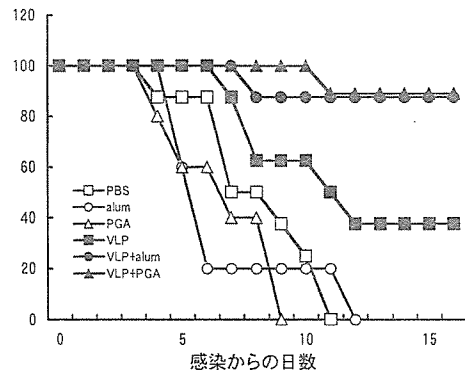


図3 VLP 1 回投与での日本脳炎ウイルス接種における防御効果。VLP ないしワクチン 1 μg を投与し、その 10 日後にウイルスを接種した。alum;水酸化アルミニウムゲル, PGA; γ PGA-NP.

D. 考察

VLP の 2 回単独投与による中和抗体価は、現行の JE ワクチンと比べて低いものであったが、ウイルス攻撃試験では、高い防御効果を得られた。中和抗体価については、VLP に水酸化アルミニウムゲル

や γ PGA-NP を併用投与することによって中和活性がさらに増強されることを明らかにした。現行のワクチンの製造には製造工程でJEウイルスの大量培養を行う必要があり、安全上問題である。故に、VLPと水酸化アルミニウムゲルによる新たな日本脳炎ワクチンのモデルは、ワクチンの製造過程、病原体取り扱いレベル、作業コストの低減などを実現する可能性の高いものであると思われる。

VLP とアジュバントとの1回での併用投与によってマウスに対して高い防御効果の傾向を示した。しかし、ブースター効果を必要としない強力なワクチン効果を有すると明言するためには更なる再試験での確認および再現性を示すことが必要である。行われた実験は、まだ2回にすぎず、また、1回投与系での中和抗体価については現在検討中である。また、現行の不活化ワクチンの1回投与群でのJEウイルス接種後のマウスの生存率についても現在検討中であり、VLP とアジュバントの1回併用投与による結果が、現行のワクチンと比較して効果が強力であるか否かは現時点では明らかではない。今後のさらなる検討が必要である。

E. 結論

1. VLP は、JEウイルスに対する中和活性を誘導するが、その強さは現行の不活化ワクチンよりも低い傾向にある。
2. VLP に水酸化アルミニウムゲルあるいは γ PGA-NP を併用投与することにより、中

和活性が増強された。

3. マウスへのVLP単独投与（2回投与）によってもウイルス攻撃試験において防御効果が認められた。
4. VLP に水酸化アルミニウムゲルあるいは γ PGA-NP を併用投与（1回投与）することによりウイルス攻撃試験において防御の傾向が見られた。今後、さらに検討していく予定である。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

学会発表

吉井洋紀, Pranee Somboonthum, 山岸義晃, 岡本成史, 小島朝人, 石川豊数, 山西弘一, 森 康子;

日本脳炎ウイルス Virus -Like Particles (VLP) を用いたワクチン効果の検討 アジュバント併用投与に関して— 第10回日本ワクチン学会学術集会（大阪）2006年10月21—22日

H. 知的財産権の出願 登録状況

なし

治療法開発のためのウイルス高病原性機序の解明

分担研究者 佐多徹太郎（国立感染症研究所感染病理部）
研究協力者 岩田奈織子、永田典代、長谷川秀樹、原嶋綾子、波多野焯持、
佐藤由子（同感染病理部）

研究要旨 ウエストナイルウイルス(WNV)の日本への侵入は現在ないが、日本国内での流行に備えて準備が必要である。そこで、WNV の病態解明および開発した治療薬あるいはワクチンを評価するための動物モデルの作製を試みた。BALB/c マウスに WNV を感染させた結果、マウスは削瘦、沈鬱などの臨床症状を示した。組織学的検索で、これらのマウスの一部に脳炎が見られ、免疫組織化学法により神経細胞に WNV 抗原が検出された。一方で、腸管病変を示す個体が見られ、BALB/c マウスでは、ヒトの病変とは異なる病態をも示す可能性があることが判明した。

A. 研究目的

WNV 熱・脳炎は現在、日本への侵入は認められていない。しかし、このウイルスに高感受性を示す鳥や蚊は日本にも存在していることから、WNV が日本に侵入した場合に備える必要がある。日本には WNV と血清学的に近縁な日本脳炎ウイルス (JEV) が存在しており、鑑別が難しい。そこで WNV による神経病変機序の病理学的解析、WNV 熱・脳炎の病態解明、開発した治療薬およびワクチンの評価を目的とし、WNV 動物モデルの作製を試みた。

B. 研究方法

JEV および WNV 動物モデルの作製

1) ウイルス

ウイルスは WNV(NY99/6922 株: 4.0×10^7) を VeroE6 細胞に接種し 2 日の培養上清を使用した。なお、VeroE6 細胞を用いたプラークアッセイにより 4.0×10^7 pfu/mL のウイルス力価であった。

2) 動物および検索方法

BALB/c マウス、雌、8 週齢にウイルス液を静脈内(200 μ L)、皮下(100 μ L)接種し、21 日間経過を観察した。臨床症状を示したマウスについては、その時点で過麻酔による安楽殺を行い、心臓採血後に 10%緩衝ホルマリンで還流固定し、脳、脊髄を中心に全身臓器を採取

した。常法通り、パラフィン切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色と脳、脊髄は Klübar-Barrera (KB) 染色も行った。さらに、抗 WNV 抗体を用いた Labeled StreptAvidin-Biotin (LSAB)法(ダコ LSAB キット、DakoCytomation) による免疫組織化学染色を行った。

なお、感染実験は国立感染症研究所村山分室高度安全実験施設においてバイオセーフティーレベル 3 病原体取り扱い規定と、動物実験委員会規定に従い実施した。

C. 研究結果

臨床症状と肉眼所見

接種 5 日目から体重減少、立毛、目やに、削瘦、沈鬱などの神経症状が見られ、一部の個体では後駆麻痺を示した。瀕死マウスおよび死亡したマウスについて解剖を行ったところ、肉眼的に腸管内出血を起こした例が見られた。この病変は空腸から回腸付近に発生しており、重度のマウスでは出血に加え、腸管全域にわたって鼓腸状態となっていた。これらの病変はいずれの接種経路でも引き起こされた。

組織学的検索

発症マウスの一部で脳あるいは脊髄に神経の急性壊死、単核系細胞を中心とする血管周

囲性細胞浸潤が見られ、脳炎像を呈していた(図 1a-c)。病変にほぼ一致して神経細胞に抗原が検出された(図 1d-f)。

一方で、腸管病変の見られた個体では、組織学的に壊死性小腸炎であることが確認され、粘膜上皮のびらんから潰瘍に至るまで、重症度は様々であった(図 2a-d)。また、パイエル板では上皮細胞が剥離し、リンパ球の減少がみられた(図 2e-h)。これらの腸管にウイルス抗原は検出されなかった。

そのほかの臓器に組織学的変化はなかった。臨床症状を発生し瀕死状態であったにも関わらず、組織病変、ウイルス抗原が陰性である個体も数例存在しており、詳細を解析中である。なお、21日間、生存したマウスの諸臓器に病変はなく、WNV 抗原も陰性であった。

脳と腸管病変の出現について

組織病変を脳炎のみ、脳炎+腸炎、腸炎のみ、組織病変なしの4つに分類し、接種ウイルスの濃度、経路別または解剖した日数別に特徴を見た。ウイルス濃度、経路別では病変の出現に対し特徴は見られなかったが、解剖日別に分類すると7,8日目に瀕死となったマウスに腸管病変の出現が多いことが分かった。しかし、脳炎および病変なしについては、どの解剖日にも出現しており、特徴は明らかにならなかった。

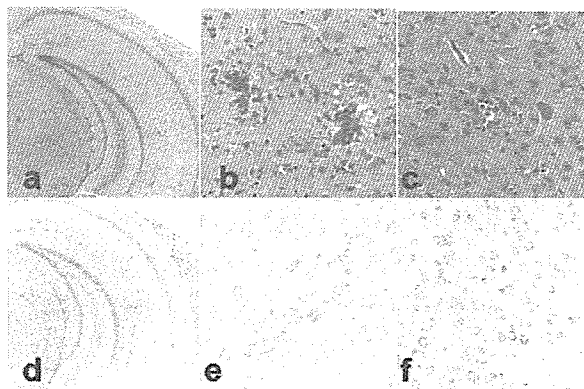


図 1. 脳病変.a: 大脳 HE 染色、b:血管周囲性細胞浸潤、c: 神経食現象、d, e, f: 同部位抗 WNV 抗体によるウイルス抗原の検出

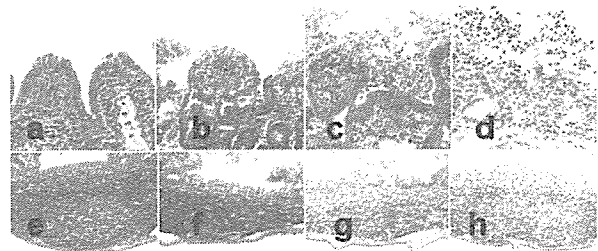


図 2. 腸管病変. a-d: 小腸 HE 染色、e-h: 小腸パイエル板 HE 染色

D. 考 察

BALB/c マウスに WNV を静脈内および皮下の2経路で接種したところ、いずれの経路でも神経症状あるいは腸管病変を発症した。発症した数例のマウスにヒトの症例と同じ脳炎あるいは脳脊髄炎が見られた。しかし、臨床症状を示した全てのマウスに脳炎が見られていないため、WNV 脳炎モデルとしては不十分である。また、今回のマウスでは腸管病変の発生が見られたが、腸管にウイルス抗原は検出されなかったため、ウイルスによる直接的な影響かどうかはわからなかった。ヒトの症例では腸管病変は報告されていないが、吐き気、腹痛などの臨床症状が報告されている。それとの関連性を考慮し、WNV 感染マウスの腸管病変の発生について原因を追究したい。

なお、今回示さなかったが、比較対象として実施した、JEV 感染実験では神経症状を発症したマウスは全て脳、脊髄に病変が見られ、腸管病変は見られなかった。また JEV 抗原は比較的形態の保たれた神経細胞の細胞質に局在しており、症状、病変ともヒトの JEV 症例と類似していると考えた。

WNV 動物モデルの作製には改善が必要となったが、モデル作製にあたり WNV 抗原に陽性となった感染マウスは、WNV のリファレンス材料として利用できる。

E. 結 論

本年度は、病態解明およびワクチン評価のための WNV 感染モデルの作製を試みた。BALB/c マウスでは脳炎と腸炎を発症するこ

とが明らかとなったが、その病態は不明である。WNV 脳炎発症モデル開発に向けて来年度は引き続き詳細な病理学的検討を予定している。

F. 健康危険情報
とくになし。

G. 研究発表
1. 論文発表

なし

2. 学会発表
なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし

2. 実用新案登録
なし

厚生労働科学研究費補助金（新興再興感染症研究事業）
分担研究報告書

弱毒化ウエストナイルウイルス（WNV）の作製に関する研究
- WNV E 蛋白質糖鎖付加の粒子形成と細胞変性作用への影響

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、橋本新吾、高島郁夫
（北海道大学大学院獣医学研究科）
高木弘隆、倉根一郎（国立感染症研究所）

研究要旨：ウエストナイルウイルス（WNV）に対するヒトでの有効なワクチンの開発と、ワクチン候補ウイルスの有効性と安全性をウイルス学的に検討する方法として、組み換えウイルスの作製とその有用性について検討している。今回、PCRにより作製したWNV NY株（NYV）のゲノムcDNA（recNYV）と、そのE蛋白質糖鎖付加部位に変異を導入したゲノムcDNA（recNYV/-Gly）を鋳型として、*In vitro*で合成したRNAを293T細胞に導入し、培養上清中に放出された組み換えウイルスを回収した。recNYV/-GlyはrecNYVに比べ、細胞内に合成されたE蛋白質量に差は認められなかったが、ウイルスの産生量は顕著に少なかった。この結果は、WNV E蛋白質の糖鎖付加がウイルスの粒子形成に関与していることを強く示唆している。また、recNYV/-Glyでは、細胞に対する変性効果もNYVやrecNYVに比べ弱かった。従って、recNYV/-GlyではrecNYVに比べ弱毒化しており、ワクチン候補ウイルスの一つとなり得るものと考えられる。

A. 研究目的

ウエストナイルウイルス（WNV）は、1937年にアフリカのWest Nile地方で初めて同定されて以来、アフリカやヨーロッパ各地、東アジアで散発的な流行が認められていた。しかし北アメリカでは、1999年にニューヨークで初めてWNVの流行が報告されて以来、毎年、その流行の範囲を拡大し、今ではカナダや中南米まで広がっている。ウマのWNVに対するワクチンは開発され使用されているが、ヒトでの有効なWNVワクチンは今のところ無い。

そこで本研究では、新規WNVワクチンの開発を目指し、昨年度までに私たちが確立したWNVのリバースジェネティクス法を用いて、弱毒化組み換えウイルスの作製と有効性を検討することを目的とした。

B. 研究方法

組み換えWNV NY（recNYV）は、昨年度

の報告書に記した方法に基づいて作製した。WNV NY株（NYV）の1-3,640 ntのcDNA（I）と3,641-11,029 ntのcDNA（II+III）を含むプラスミドを用いて、その5'末端にSP6 RNAポリメラーゼのプロモーター配列を付加したゲノム全長のcDNA（I+II+III）をStiching PCRにより作製した（図1A）。このcDNA（I+II+III）を鋳型として、*In vitro*でrecNYVのRNAを合成し細胞に導入した。導入後72時間に培養上清を回収し、使用するまで-80℃に保存した。次に、E蛋白質糖鎖付加部位に変異を導入し、糖鎖の付加を欠損させた組み換えWNV NY（recNYV/-Gly）を以下の様に作製した。ウイルスのC蛋白質のN末端より446番目のアミノ酸であるSer（S）（E蛋白質の糖鎖付加部位）をPro（P）に置換する変異を導入したcDNAを合成し、これを基にしてrecNYV/-Glyを作製した。recNYVとrecNYV/-Glyの増殖性や粒子形成、細胞変性効果を検討した。

(倫理面への配慮)

本研究は、文部科学大臣の承認（北海道大学、代表：高島）を受けた、組み換え DNA 実験である。また、ヒトや動物あるいはそれらに由来するサンプルを使用しないため倫理上の配慮は必要としない。

C. 研究結果

組み換え WNV の作製：今回作製した組み換え WNV、recNYV と recNYV/-Gly の全遺伝子配列を決定したところ、recNYV の遺伝子配列は親ウイルスである NYV のものと完全に一致していた。一方、recNYV/-Gly の遺伝子配列は導入した変異部位以外の遺伝子配列は、NYV および recNYV と一致しており、目的通りの組み換え体が得られた (図 1B)。

recNYV と recNYV/-Gly の増殖性：NYV あるいは recNYV、recNYV/-Gly を Vero E6 細胞に感染し、培養上清中に放出されるウイルス粒子数の経時的な変化について検討した。NYV と recNYV の増殖に差は認められなかったが、recNYV/-Gly では前二者に比べウイルスの増殖は顕著に悪かった (図 2)。

recNYV と recNYV/-Gly のウイルス粒子形成能：recNYV と recNYV/-Gly を Vero E6 細胞に感染後 48 時間における細胞内と培養上清の E 蛋白質量を Western blot により解析した (図 3)。細胞内 E 蛋白質量は、両ウイルス間で差は認められなかった

(図 3B)、一方、培養上清中に放出された recNYV/-Gly の E 蛋白質量は recNYV と比較して顕著に少なかった (図 3A, 3C)。また、Lectin blot 解析により今回作製した recNYV の E 蛋白質は糖鎖が付加されており、recNYV/-Gly の E 蛋白質は糖鎖が付加されていないことが証明された (図 3D)。

recNYV と recNYV/-Gly の細胞変性効果：NYV あるいは recNYV、recNYV/-Gly を Vero E6 細胞に感染し、48 時間後の細胞を顕微鏡下で観察した。recNYV/-Gly を感染した細胞 (図 4G, 4H) では、NYV (図 4C, 4D) や recNYV 感染細胞 (図 4E, 4F) に比べ細胞変性が顕著ではなかった (図 4)。

D. 考察

昨年度、私たちが報告した組み換え WNV 作製法の有効性が、本研究により証明された。Stitching PCR を利用した本法は、組み換え WNV のコンストラクトの構想から作製までを一週間弱で終わることが可能であるため、他の方法に比べて短時間に目的の組み換え WNV が得られる。また、今回の組み換え WNV のコンストラクト中は、遺伝子配列も安定に維持されていたため私たちの方法は信頼性の高い方法であると考えられた。

recNYV/-Gly は今回行った細胞培養系の実験においては、親ウイルスである NYV や recNYV に比べて弱毒化しており、WNV に対する新規ワクチンとなる可能性がある。今後、マウス等の実験動物を使用して、ワクチンとしての有効性と安全性について検討する必要がある。

E. 結論

昨年度、私たちが開発した Stitching PCR を利用した組み換え WNV の作製方法は、ある変異を導入した組み換えウイルスを迅速に作製できることが証明された。また今回作製した糖鎖付加されない組み換え WNV (recNYV/-Gly) は弱毒化しており、WNV に対する新規ワクチン候補となる可能性が示された。

F. 健康危機情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

- 1) ウエストナイルウイルスのレプリコンの作製. 橋本新吾、前田潤子、高木弘隆、堀内基広、高島郁夫、倉根一郎、前田秋彦. 第 54 回日本ウイルス学会、2006 年 11 月、名古屋
- 2) ウエストナイルウイルスのマイナス鎖 smallRNA の合成. 前田秋彦、前田潤子、高木弘隆、堀内基広、倉根一郎. 第 54 回日本ウイルス学会、2006 年 11