

月、名古屋

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
特になし。
2. 実用新案登録
特になし。
3. その他
特になし。

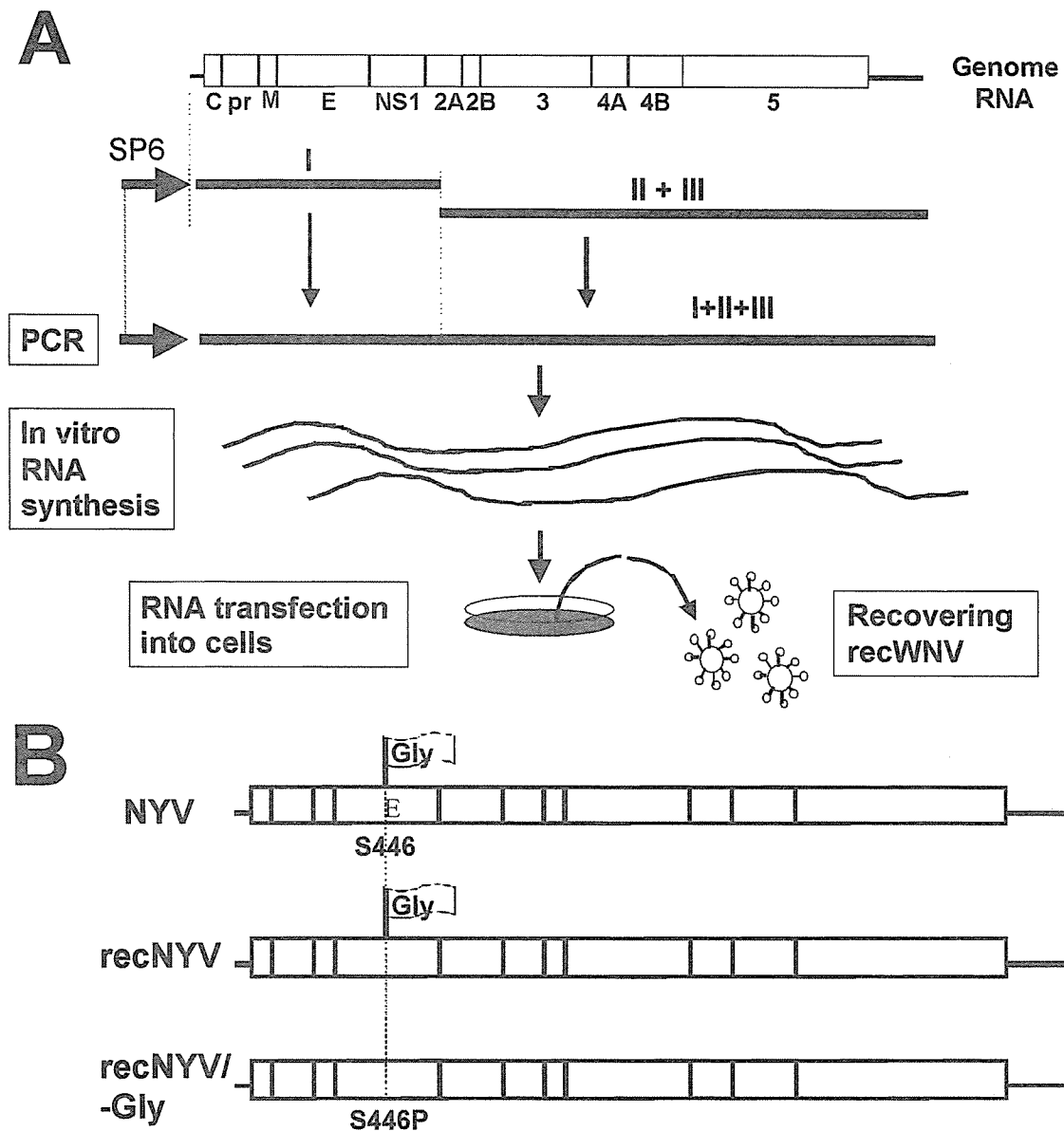


図1. Stitching PCR を用いた組み換え WNV の作製

A. Stitching PCR を用いた組み換え WNV の作製方法を示す。WNV の NY 株の 1～3,640 nt (I) と 3,640～11,029 nt (II+III) の cDNA を含むプラスミドを用いて、5' 端に SP6 RNA polymerase のプロモーター配列を付与したゲノム全長の cDNA (I+II+III) を PCR により合成する。この cDNA (I+II+III) を鋳型として *In vitro* で合成した RNA を細胞に導入し、培養上清中に放出される組み換えウイルスを回収する。B. 今回作製した 2 種類の組み換えウイルス (recNYV, recNYV/-Gly) のゲノム構造を示す。一番上は親ウイルスである NYV のゲノムを記す。Gly の旗は E 蛋白質上の糖鎖付加部位を示す。

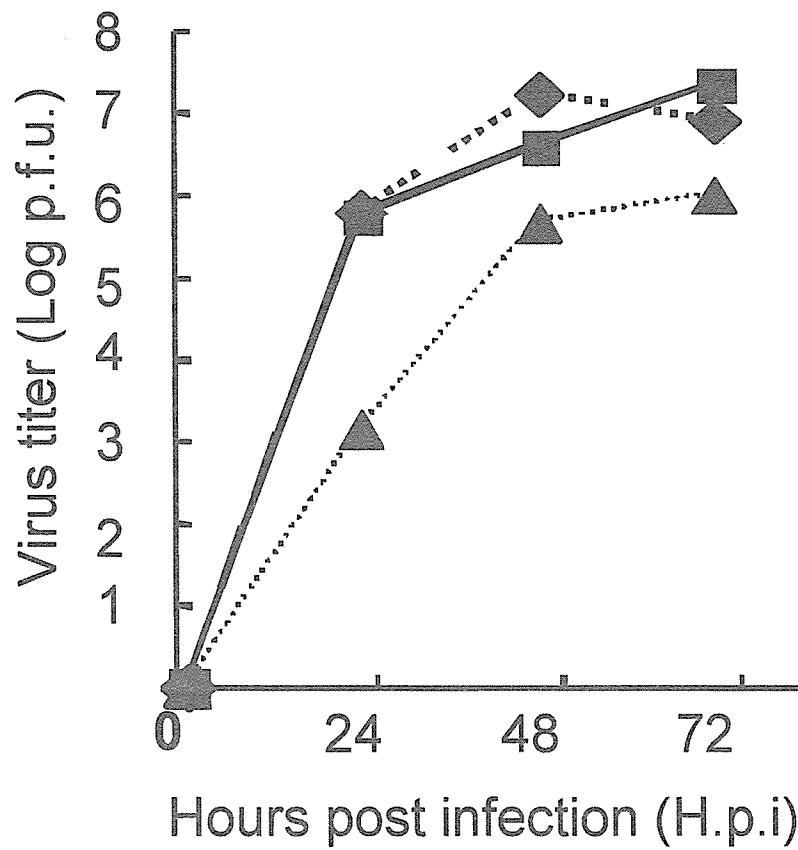


図2. WNV 由来組み換えウイルスの感染性ウイルス粒子産生の比較

NYV (—■—), recNYV (···◆···) および recNYV(-Gly) (···▲···) を Vero E6 細胞に感染し、感染後培養上清に放出されるウイルス価を Plaque assay により経時的に観察した。

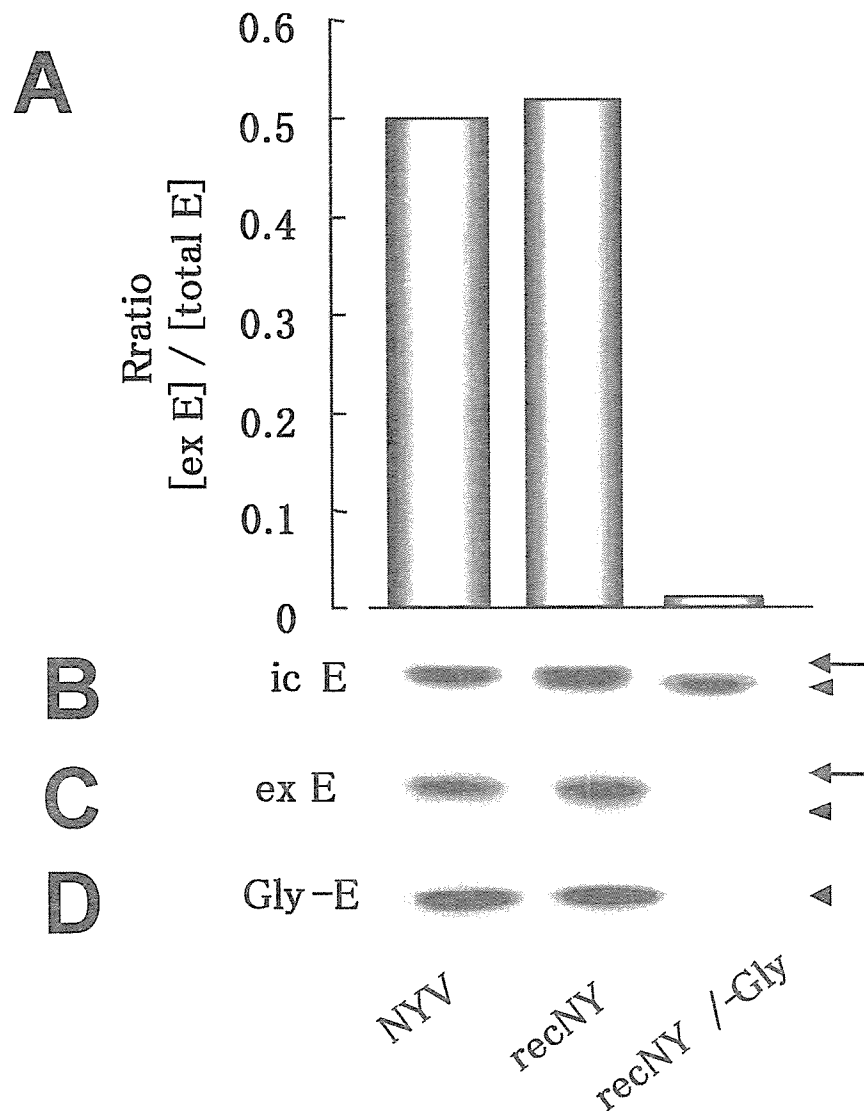


図 3. 組み換え WNV の粒子形成

NYV, recNYV および recNYV/-Gly を Vero E6 細胞に感染し、感染後 48 時間での細胞内 (B) および培養上清中 (C) の E 蛋白質を Western blot により解析した。更に、発現した全 E 蛋白質量における培養上清に放出された E 蛋白質量を Las3000 により定量化し、その比をグラフに示す (A)。また、各ウイルスの E 蛋白質の糖鎖付加について、Lectin blot 解析した。矢印は糖鎖付加された、矢頭は糖鎖付加されない E 蛋白質を示す。

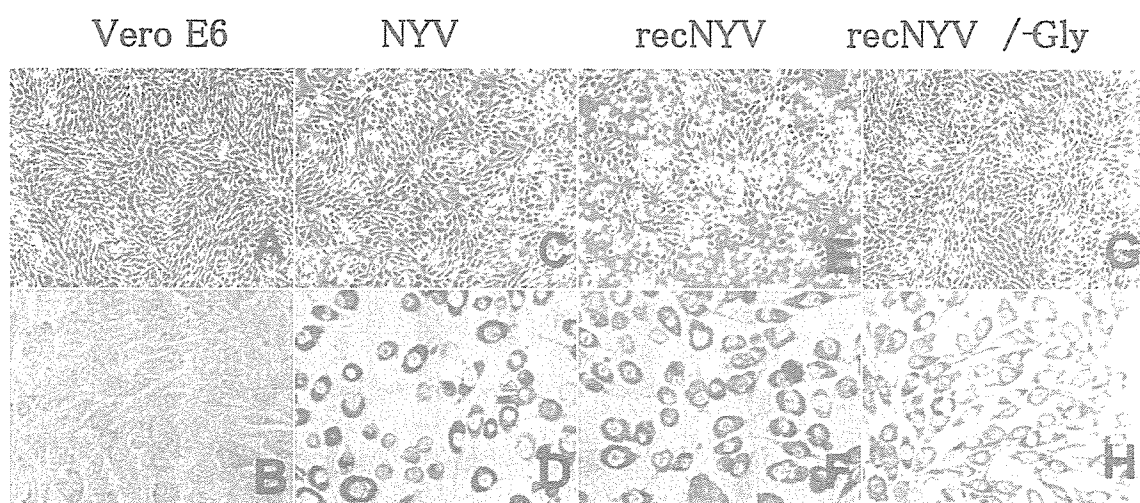


図 4. WNV 由来組み換えウイルスの細胞変性効果

NYV (C と D) , recNYV (E と F) および recNYV/-Gly (G と H) を Vero E6 細胞に感染した。感染後 48 時間における細胞変性を顕微鏡下で明視野観察 (A、C、E および G) した。次に、細胞をホルマリンで固定し、抗 WNV E 抗体を反応させた (B、D、F および H)。陰性コントロールとして、非感染の Vero E6 細胞を用いた。

分担研究報告書

ウエストナイルウイルスによる脳炎発症に関わる T 細胞の解析

主任研究者 倉根 一郎 国立感染症研究所ウイルス第一部 部長
分担研究者 鈴木 隆二 国立病院機構相模原病院 臨床研究センター 室長
協力研究者 藤井 克樹 国立感染症研究所ウイルス第一部 大学院生

研究要旨： ウイルス感染時において、細胞性免疫はウイルス感染細胞の排除に重要な役割を担っていると考えられているが、タイラーウイルス(Lindsley MD et al. 1989. J. Immunology 142: 2677-2682) や、マウス肝炎ウイルス (Castro RF et al. 1994. Virology 200: 733-743)などの例では、この細胞性免疫が脳炎、脱髄の重症化に寄与するという生体にとって極めて有害であるという報告もある。ウエストナイルウイルス(WNV)は、1999 年のニューヨークでの発生で特に注目を集め、その後、急速に感染が拡大し 2002 年にはほぼ全米を席卷し、2005 年には国内で初めて輸入症例ではあるが患者が確認された。我々は、マウスを用いた WNV 脳炎モデルにおいて、細胞性免疫の中でも特に免疫調節に関与する T 細胞に着目し、これが脳炎の発症と防御に果たす役割を明確に解明する事を目的に、WNV と同じ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(JEV)感染脳炎マウスモデルを用いて、脳炎発症に伴って脳内に浸潤する T 細胞について、T cell receptor(TCR)レパトア解析を行った。その結果、感染 12 日目の脳内には特徴的な TCR レパトアの偏りが観察された。また、各レパトアに対して size spectratyping により clonality を検討した。その結果、TCR β 鎖においては、偏りのあるレパトア中に高い clonality が認められた。TCR α に関してはレパトアの偏りと clonality は必ずしも一致していなかったが、複数の個体間で CDR3 に同一のアミノ酸配列を示すクローンが存在していた。以上の事から、近交系マウスを用いた JEV 脳炎モデルでは、脳内に浸潤した T 細胞はクローンレベルで非常に近似した JEV 抗原エピトープを認識している事が示唆された。今後は、WNV 系での解析を行ない、脳内浸潤 T 細胞の機能と脳炎病態に対する関与を明らかにする予定である。

A. 研究目的

WNV 感染時に脳内に浸潤する T 細胞と特異性をクローンのレベルで解析する事が本研究の意義を遂行する上で必須である。我々は、組織に存在する TCR レパトアの存在比を正確に解析する手法を確立してきた。また、抗原認識部位である CDR3 領域の解析にはスペクトラ解析を行ない Clonality を決定し、そのアミノ酸配列を決定してきた。さらに、脳内浸潤細胞から T 細胞のクローン化法、ペプチドマッピング法も現有している。本 TCR レパトア解析法は、これまで関節リウマチなどの自己免疫疾患や、一部の感染症における病態と T 細胞との関連性についての貴重な知見をもたらしている。本研究により、TCR の解析からウエスト

ナイル脳炎の病態メカニズムが解明される事により、新たなエピトープを用いた安全かつ効果的なワクチン開発や、脳炎を軽減する治療法開発につながる可能性を探索する事を目的とする。

B. 研究方法

- a) 動物感染実験： ヒトから分離され、乳飲みマウスの脳で継代した日本脳炎ウイルス株である JaTH160 (GenBank: AB269326) を用いて、日本脳炎ウイルスに対する感受性が高いことが知られる C3H/He の LD₅₀ 値を求めた。投与ルートは、神経病原性と神経侵入性の両方を反映する腹腔内接種により行なった。
- b) サンプル採取および病理学的検討： JaTH160 株をマウスに 100LD₅₀ 腹腔内接

種し、脳を採取した。この際に、末梢血リンパ球の混入を防ぐため、PBSにて灌流を行い採脳した。脳は直ちに RNA 安定化試薬に浸漬して、組織内 RNA を安定化させ、これをサンプルとして total RNA を抽出した。また、一部の脳は病理学的評価に用い、リンパ球の浸潤程度を HE 染色により評価した。

c) TCR レパトア解析： 脳から抽出した total RNA をサンプルとして、TCR レパトア解析を行なった。total RNA から cDNA を合成した後、adaptor を付加し、いで消化酵素処理により adaptor 付加 cDNA を適当な形にし、adaptor および TCR 定常領域にそれぞれ相補的なプライマーセットを用いて nested PCR を行った。これにより、全ての TCR をコードする遺伝子を同一条件下で特異的に増幅させることが可能であり、得られた PCR 産物を、全ての TCRAV ファミリーおよび TCRBV ファミリーにそれぞれ相補的なオリゴ DNA を固層化したマイクロプレートに播種してハイブリダイズさせた後、酵素反応を用いて発色させ吸光度を測定する。得られた吸光度から、各 TCR V ファミリーの存在率を算出することにより、mRNA レベルにおける脳内浸潤 T 細胞の TCRV ファミリーの偏在性を検討した。

d) T 細胞 clonality および CDR3 シークエンス解析： 日本脳炎ウイルス感染マウスの脳内における TCR レパトアの全てについて、CDR3 size spectratyping によりフラグメント解析を行い、T 細胞の clonality を確認した。さらに各 TCR 遺伝子を TA-cloning 法によりプラスミドにクローニングし、塩基配列を解析することにより、CDR3 シークエンスレベルの発現頻度を解析した。これにより、日本脳炎感染マウスの脳内浸潤 T 細胞における TCR 遺伝子発現頻度をライブラリとして構築した。

(倫理面への配慮)： 本研究における動物実験は、「動物の愛護及び管理に関する法律の一部を改正する法律（平成 17 年法律第 68 号）」による「実験動物の使用及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準（平成 18 年度環境省告示第 88 号）」及び文部科学省が策定した「研究機関等における動物実験等の実施に関する基準

（平成 18 年 6 月 1 日告示）」に基づき、日本学術会議が作成した「動物実験の適正な実施に向けたガイドライン（平成 18 年 6 月 1 日通知）」を踏まえて、国立感染症研究所で定めた所内規定を遵守して行った。

C. 研究結果

WNV 感染系での解析に先行し、JEV 感染系で以下の検討を終了した。

(1) 正常マウスの脾臓を用いて、マウスにおける TCR レパトア解析法の手技、反応条件等を確立した。また、脾臓の TCR レパトアが、末梢血リンパ球や各部リンパ節のレパトアと大きな差異がないことを確認した。

(2) JEV 感染マウスモデルを用いて、PBS による全身灌流後の脳サンプル採取法、および脳組織の病理学的解析法を確立した。日本脳炎においてはウイルス接種後 6-8 日目以降に、著明な髄膜炎や海馬周辺を始めとした神経細胞の壊死などが認められた。

(3) JEV 感染マウスモデルにおいて TCR レパトア解析を行い、脳内浸潤細胞のレパトアが末梢血リンパ球（脾臓）のそれと比較して大きく偏っていることを明らかにした。V α 5-1, V α 17-1, V α 18-1, V β 2-1, V β 6-1, V β 8-1, V β 8-3, V β 13-1 に偏りが観られた。

(4) CDR3 size spectratyping を行い、日本脳炎ウイルス感染マウスにおける脳内浸潤 T 細胞の clonality を解析した。その結果、V α 2-1, V α 4-2, V α 4-5, V α 5-1, V α 6-1, V α 9-1, V α 11-1, V α 17-1, V α 18-1, V β 8-3, V β 13-1 において高い clonality が認められた。これらの CDR3 アミノ酸配列を詳細に解析中であるが、V α に関しては、異なる個体間で同一のクローンが高頻度に存在している事が確認され、V β に関しても、1 アミノ酸の違いはあるが、極めて近似した配列を有していた。

D. 考察

ウエストナイル脳炎に対する解析に先行した日本脳炎モデルマウスの解析から、実験的感染後に、脳内に細胞浸潤が観察された。TCR レパトア解析においては、正常コントロールの脳では全く存在しないシグナルが JEV 感染後に経時的に検出され、脳炎の進展と T 細胞浸潤が同時期に惹起している事が示唆された。JEV 感染後に浸潤した T 細胞は、TCR レパトア解析および size

spectratyping 解析により、クローンとして存在していることから、JEV-specific T 細胞であると考えられた。これら JEV-specific T 細胞の病態への関与は今後の検討によるが、脳内で起きている免疫応答について、今後は、サイトカインの real-Time PCR を行い、そのタイプを決定する予定である。

E. 結論

今回の解析から、JEV 感染後の脳内には極めて限定した T 細胞の浸潤が示された。

F. 健康危険情報

特記事項なし。

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（予定を含む。）

1. 特許取得

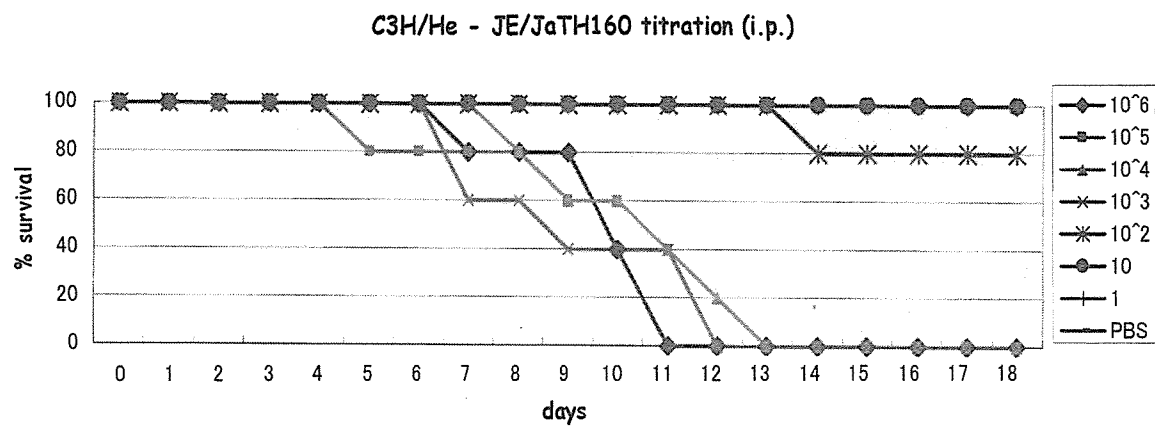
なし。

2. 実用新案登録

なし

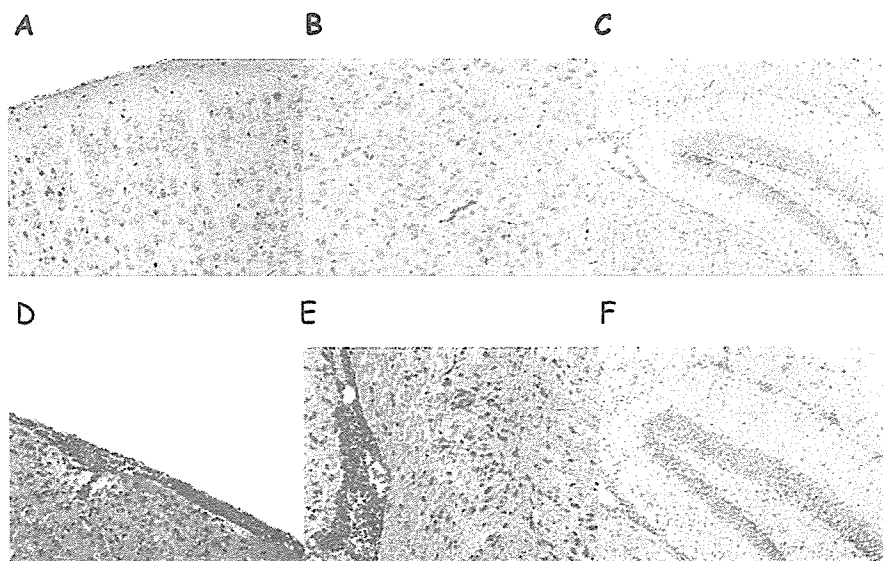
3. その他

特になし



$1.2 \times 10^2 \text{ pfu/LD}_{50}$

Fig-1: Titration of JEV/JaTH160 in C3H/He mouse

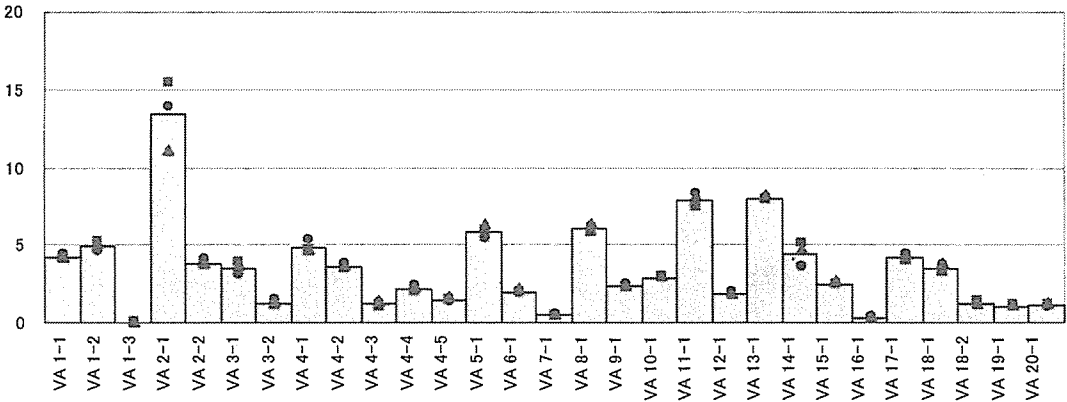


A,B,C: Control(C3H/He,PBS)

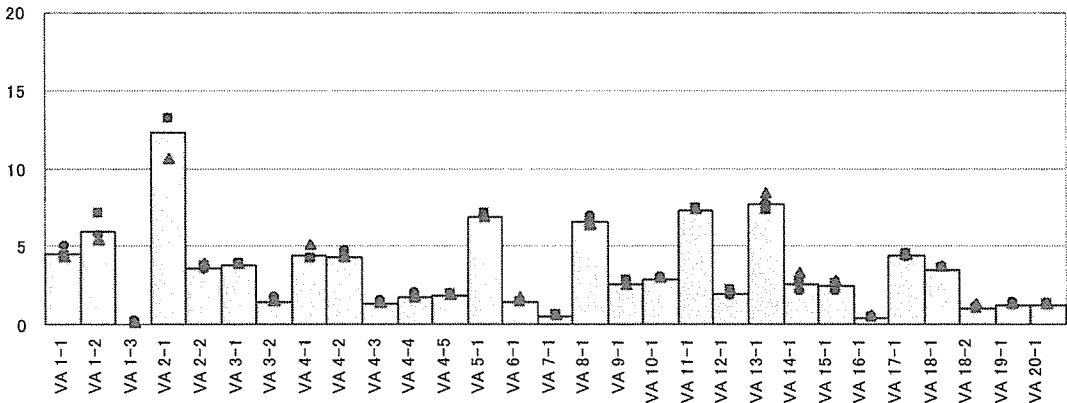
D,E,F: 100LD₅₀(JEV,ip,12d)

Fig-2: Histopathology of mouse brain infected with JEV

PBS Control (Spleen)



JEV infected (Spleen)



JEV infected (Brain)

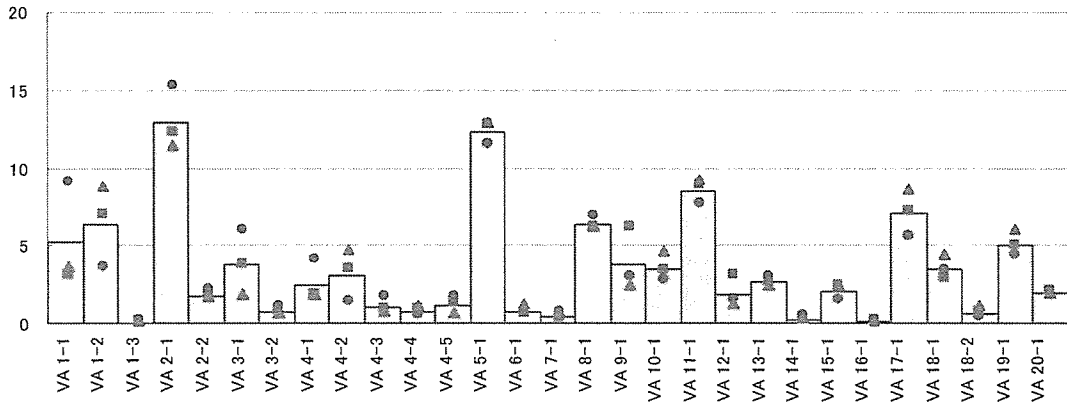
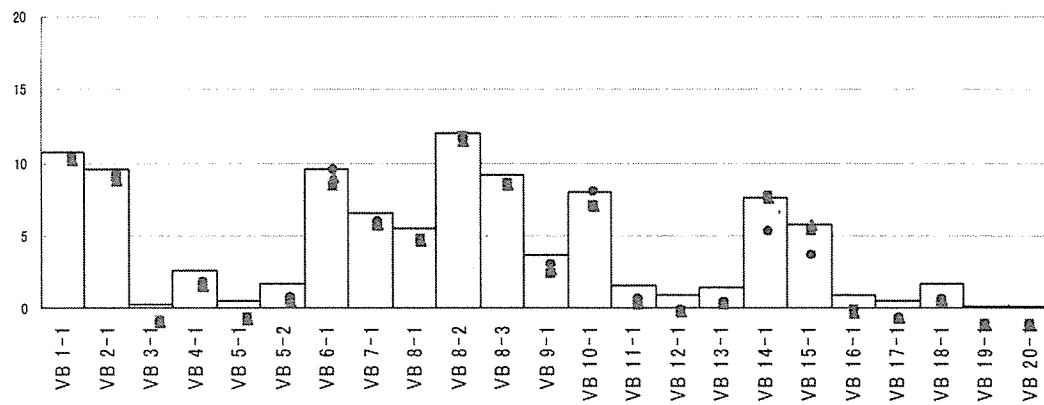
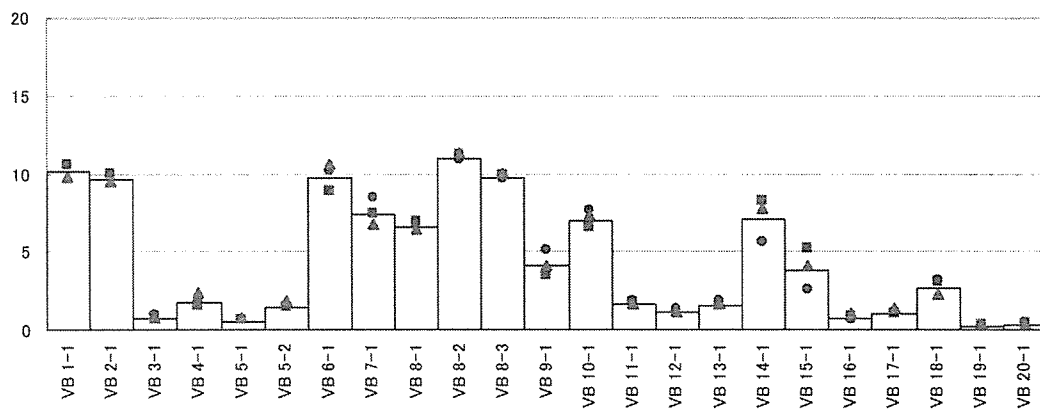


Fig-3: TCRVA repertoire analysis of JEV infected mouse

PBS Control (Spleen)



JEV infected (Spleen)



JEV infected (Brain)

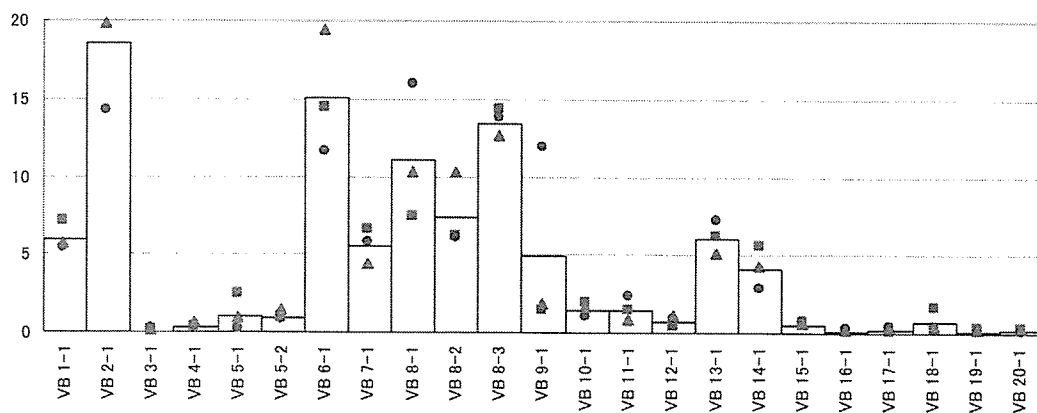


Fig-4: TCRVB repertoire analysis of JEV infected mouse

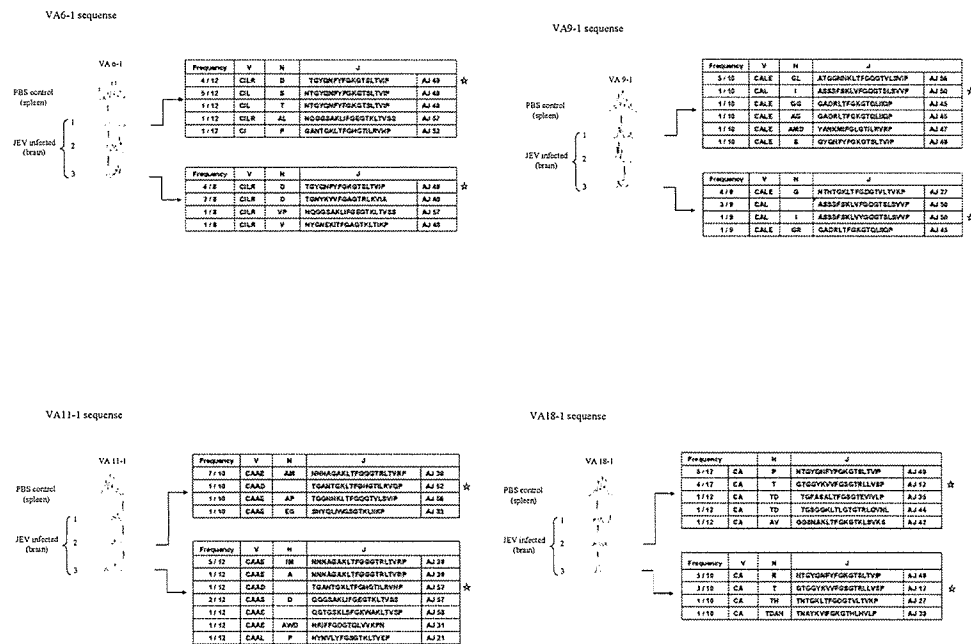


Fig5: Size spectratyping and CDR3 sequence of TCRVA of JEV infected Brain

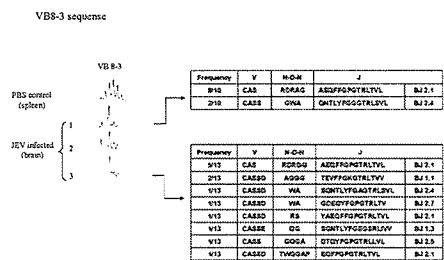


Fig6: Size spectratyping and CDR3 sequence of TCRVB of JEV infected Brain

別紙 4

研究成果の刊行に関する一覧表

発表者氏名	論文タイトル名	発表雑誌名	巻名	ページ	出版年
Paresh Sumatilal Shah, Kouichi Morita、他	Molecular characterization of attenuated Japanese encephalitis live vaccine strain ML-17.	Vaccine	24	402-411	2006
Parida, M. M., Morita, K. 他	Development and Evaluation of Reverse transcription-Loop-Mediated Isothermal Amplification Assay for Rapid and Real-Time Detection of Japanese Encephalitis Virus.	J. Clin. Microbiol.	44	4172-4178	2006
Hoshino K., Isawa H., Tsuda Y., Yano K., Sasaki T., Yuda M., Takasaki T., Kobayashi M. and Sawabe K.	Genetic characterization of a new insect flavivirus isolated from <i>Culex pipiens</i> mosquito in Japan.	Virology	359	405-414	2007
Higa, Y., Hoshino, K., Tsuda, Y., Kobayashi, M.	Dry ice-trap and human bait collection of mosquitoes in the eastern Hokkaido	Japan. Med. Entomol. & Zool.	57	93-98	2006
Hamano, M., Lim, C.K., Takagi, H., Sawabe, K., Kuwayama, M., Kishi, N., Kurane, I.,	Detection of antibodies to Japanese encephalitis virus in the wild boars in Hiroshima prefecture, Japan.	Epidemiology and Infection	12	1-4	2007

Takasaki, T.					
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	36	910-913	2006
森田 公一	西ナイルウイルスとワクチン開発	感染炎症免疫	36	242-244	2006
鈴木智之、岡部信彦	注意すべき海外感染症の動向	成人病と生活習慣病.	36	820-824	2006
澤邊京子, 星野啓太, 伊澤晴彦, 佐々木年則, 伊藤美佳子, 高崎智弘, 江下優樹, 小林睦生	蚊からのウエストナイルウイルスの検出法および分離法の検討	Med. Entomol. & Zool.	57	279-286	2006
津田良夫, 比嘉由紀子, 葛西真治, 伊澤晴彦, 星野啓太, 林利彦, 駒形修, 澤邊京子, 佐々木年則, 富田隆史, 二瓶直子, 倉橋弘, 小林睦生	成田国際空港近接地と周辺地域の媒介蚊調査 (2003, 2004 年)	Med. Entomol. & Zool	57	211-218	2006
津田良夫, 比嘉由紀子, 倉橋弘, 林利彦, 星野啓太, 駒形修, 伊澤晴彦, 葛西真治, 佐々木年則, 富田隆史, 澤邊京子, 二瓶直子, 小林睦生	都市域における疾病媒介蚊の発生状況調査—ドライアイストラップを用いた2年間の調査結果—.	Med. Entomol. & Zool.	57	75-82	2006
小泉加奈子, 中島由紀子, 松崎	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

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					
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