

検出できる症例が存在することが確認された。そして、ウイルス血症が消退した後に、ウイルス遺伝子を検出できることは病原体診断上非常に意義がある。尿中および唾液中からのデングウイルス遺伝子の検出は通常臨床の現場では実施されていないが、一般的尿検査はよく実施されている。従って特に検体の採取に困難な小児や出血傾向の強い患者に対しては侵襲の少ないきわめて有用な方法であると考えられる。また検出期間も血清に比べ長期であったことより、解熱後の患者においてもウイルス遺伝子を検出できる可能性があるため、今後症例数を増やして検討していく予定である。

尿中に感染性ウイルスが存在するか否かに関しては、培養細胞を用いたウイルス分離を実施したが、ウイルスが分離されなかったことから、その可能性は低いものと考えられるが、発熱中はもちろん解熱後も尿や唾液の取り扱いにあたっては通常の基本的な注意が必要である。

E. 結 論

デング熱症例の中に尿中や唾液中からウイルス遺伝子を検出できる症例が存在することが確認された。そして、それらの症例ではウイルス血症が消退した後に、ウイル

ス遺伝子を検出できた。このことは、デング熱の病原体診断上非常に意義があり、今後積極的に実施するべきである。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Y. Mizuno, A. Kotaki, F. Harada, S. Tajima, I. Kurane, T. Takasaki. Confirmation of dengue virus infection by detection of dengue virus type 1 genome in urine and saliva but not in plasma. *Trans. Royal Society Trop. Med. Hyg.* 2007(in press).

2. 学会発表

高崎智彦、水野泰孝、加藤康幸、西村聖美、原田文植、田島茂、工藤宏一郎、倉根一郎。デング熱患者における尿および唾液中のデングウイルス遺伝子検出。第13回トガ・フラビ・ペスチウイルス研究会（東京）。2007年1月19日。

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表 1 Laboratory test results of plasma, PBMC, urine and saliva specimens (症例 1)

Days after onset		7d	8d	14d	25d
RT-PCR	Plasma	—	NT	—	—
	PBMC	—	NT	—	—
	Urine	+ (D1*)	+ (D1)	+ (D1)	—
	Saliva	+ (D1)	NT	NT	—
IgM	Plasma	+ (8.97**)	NT	+ (6.05)	+ (4.12)
IgG	Plasma	+ (2.04***)	NT	+ (2.29)	+ (2.36)

* D1: dengue virus type 1

** : Index value of IgM. IgM antibody is determined to be positive when index value is higher than 1.1.

*** : Index value of IgG. IgG antibody is determined to be positive when index value is higher than 1.1.

図 1 尿中ウイルス遺伝子解析 (症例 1)

06-41D1NIID	1	A TGG	CTATGGAGTTTTGTT AG GGTGTTT TCGA ATGAAAATAGGAATAGG	GTT	60
DV1 Guangdong	1	A TGG	CTATGGAGTTTTGTT AG GGTGTTT TCGA ATGAAAATAGGAATAGG	GTT	60
06-41D1NIID	61	TG TGA	ATGG TAGGATTAAA T AAGGAG A GT TTT GATGA GTG ATTG A		120
DV1 Guangdong	61	TG TGA	ATGG TAGGATTAAA T AAGGAG A GT TTT GATGA GTG ATTG A		120
06-41D1NIID	121	GTTGG TAGTAA	TATATA TAGGAGT ATGGTT AGG GGATT AGGATGTGTAATT		180
DV1 Guangdong	121	GTTGG TAGTAA	TATATA TAGGAGT ATGGTT AGG GGATT AGGATGTGTAATT		180
06-41D1NIID	181	AATTGGAAAGGTAGAGAA	T AAATGTGGGAAGTGG ATTTTTGT A AATGAAGTT A		240
DV1 Guangdong	181	AATTGGAAAGGTAGAGAA	T AAATGTGGGAAGTGG ATTTTTGT A AATGAAGTT A		240
06-41D1NIID	241	A TTGGA AGAG AATA	AAATTT AAG TGA T AAAGAGA TAT AG AG AT		300
DV1 Guangdong	241	A TTGGA AGAG AATA	AAATTT AAG TGA T AAAGAGA TAT AG AG AT		300
06-41D1NIID	301	GGGAAGG ATGGGAGGA	GGTGTGTGTGGAAAT GAT AG AA T GT T GAGAA AT		360
DV1 Guangdong	301	GGGAAGG ATGGGAGGA	GGTGTGTGTGGAAAT GAT AG AA T GT T GAGAA AT		360
06-41D1NIID	361	ATGTGGAAG AAATAT	AAATGAA TGAAT A AT TTA TTGAAAATGA ATGAAA T		420
DV1 Guangdong	361	ATGTGGAAG AAATAT	AAATGAA TGAAT A AT TTA TTGAAAATGA ATGAAA T		420
06-41D1NIID	421	A AGTGGTTGTAGGAGA	GTTG TGG		446
DV1 Guangdong	421	A AGTGGTTGTAGGAGA	GTTG TGG		446

症例 1 の遺伝子解析では、GenBank に登録されているデングウイルス遺伝子情報のなかで中国広東の分離株に最も高い相当性 (98%) を示した。

図2 症例2尿中ウイルス遺伝子解析 (症例2)

06-60.txt	1401	TAGGGAAAATGGTGCACCAAAATATTGGAA	FTGGCTTACACAGCCCTGTTT	1450
06-60Urine D3.txt	1	-----	FTGGCTTACACAGCCCTGTTT	20
06-60.txt	1451	EGTGGAGTCTCATGGATAATGAAAATTGGAATAGGTTGTCCTCTTAACCTG		1500
06-60Urine D3.txt	21		EGTGGAGTCTCATGGATAATGAAAATTGGAATAGGTTGTCCTCTTAACCTG	70
06-60.txt	1501	GATAGGCTTGAATTCAAAAAATACTTCCATGTCATTTTCATGCATTGTGA		1550
06-60Urine D3.txt	71		GATAGGCTTGAATTCAAAAAATACTTCCATGTCATTTTCATGCATTGTGA	120
06-60.txt	1551	TAGGAATTATTACACTCTATCTGGGAACTGTGGTACAAAGCTGACATGGGG		1600
06-60Urine D3.txt	121		TAGGAATTATTACACTCTATCTGGGAACTGTGGTACAAAGCTGACATGGGG	170
06-60.txt	1601	TGTGTCATAAACTGGAAAAGGAAAAGAACTCAAATGTGGAAAGTGGAAATCTT		1650
06-60Urine D3.txt	171		TGTGTCATAAACTGGAAAAGGAAAAGAACTCAAATGTGGAAAGTGGAAATCTT	220
06-60.txt	1651	CGTCACTAATGAGGTCCACACTTGGGACAGAGCAATACAAATTTCAAGGCAG		1700
06-60Urine D3.txt	221		CGTCACTAATGAGGTCCACACTTGGGACAGAGCAATACAAATTTCAAGGCAG	270
06-60.txt	1701	ACTCCCTAAAAGACTGGCCGACAGCCATTGCAGGCCCTTGGGAGAATGGA		1750
06-60Urine D3.txt	271		ACTCCCTAAAAGACTGGCCGACAGCCATTGCAGGCCCTTGGGAGAATGGA	320
06-60.txt	1751	TTTGTGGAAATCAGGCCGTAGGGGGAATAGAGA		1783
06-60Urine D3.txt	321	-----		321

尿中から検出されたデングウイルスの遺伝子産物の遺伝子配列は、急性期の血清から分離されたウイルスの遺伝子配列と100%一致した。

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

チクングニヤ熱本邦輸入 2 症例

分担研究者 高崎智彦（国立感染症研究所 ウイルス第一部）

研究協力者 林 昌宏、小滝徹、倉根一郎

（国立感染症研究所 ウイルス第一部）

水野泰孝、工藤宏一郎（国際医療センター国際疾病センター）

渡邊 香奈子（新潟県保健環境科学研究所）

チクングニヤウイルスはトガウイルス科アルファウイルス属に分類される RNA ウイルスで、蚊によって媒介されるウイルスでヒト→蚊→ヒトの感染環をもつ。その主たる媒介蚊はヤブカ属の蚊で、主としてネッタイシマカやヒトスジシマカである。

チクングニヤ熱は、発熱・関節炎・発疹の 3 主徴が特徴であり、時に出血傾向を呈するため、鑑別疾患としてデング熱があげられる。発熱と関節痛は必発であり、発疹は 8 割程度に認められる。関節痛は四肢（遠位）に強く、関節の腫脹を伴う場合もある。その他主要な症状としては、全身倦怠・頭痛・筋肉痛・リンパ節腫脹である。また出血傾向（鼻出血・歯肉出血）や悪心・嘔吐をきたすこともある。2005 年初頭にコモロ（Comoro）諸島で流行が発生した。その後、ウイルスはインド洋に位置する他の島国（モーリシャス：Mauritius, レユニオン：Reunion, セーシェル：Seychelles, マヨット：Mayotte）などに拡大し流行した。そして、この流行の主媒介蚊は本邦においても沖縄県から東北地方まで広く分布しているヒトスジシマカである。2006 年にはインド西部、スリランカでも流行をみており、香港、スイス、台湾、米国などからも輸入症例が報告されている。この感染症は、わが国では現在のところ感染症法あるいは検疫法において定められていない感染症であるが、ヨーロッパ・インド・東南アジア諸国では非常に警戒されているウイルス感染症である。本年、12 月にいずれもスリランカで感染した日本人輸入症例 2 例を確認した。

A. 研究目的

2005 年初頭にコモロ（Comoro）諸島で流行が発生した。その後、ウイルスはインド洋に位置する他の島国（モーリシャス：Mauritius, レユニオン：Reunion, セーシェル：Seychelles, マヨット：Mayotte）などに拡大し流行した。2005 年から 2006 年のインド洋諸国でのチクングニヤ熱患者数は、25 万人以上とされている。人口 77 万人のレユニオン島では 26 万 4 千人が感染したと推計され、237 人が死亡した。香港、スイ

ス、台湾、米国などからも輸入症例が報告されている。そのため、本邦でも輸入症例が発生する可能性が高いと考え、実験室診断法（病原体診断、血清診断）を用意して備えた。

B. 研究方法

病原体検出法

国立感染症研究所では、従来より P3 施設内にチクングニヤウイルス（Af 株および Ba H306 株）の 2 株を保有しており、これらのウイルスにより、下記の遺伝子検出法を評

価した。

●逆転写 PCR 用プライマーセット

- ・Chik3512s : (10273bp)
ACG CAA TTG AGC GAA GCA CAT
- ・Chik3991s : (10552bp)
AAA TTG TCC TGG TCT TCC TG

●リアルタイム PCR (TaqMan 法) 用プライマー&プローブセット TaqMan 用プローブ、プライマー

- ・Probe: Taq-Chik638P
FAM-TACCAGCCTGCACYC-MGB-3'
- ・Primer(F) : Taq-Chik607F (10849)
GCR CCM TCT KTA ACG GAC AT
- ・Primer(R) : Taq-Chik672R (10894)
GCC CCC RAA GTC KGA GGA R

血清学的検査法

(1)IgM 抗体検査法 (IgM 捕捉 ELISA)

抗体検査に必須である患者血清はフランスパスツール研究所、National Reference Center for Arbovirus and Viral Hemorrhagic Fevers) の Dr. HERVE ZELLER から無償で供与いただいた。二次抗体として使用する抗チクングニヤウイルス抗体は、Anti-CHIKV polyclonal Antibody Mouse immune ascitic fluid ATCC VR-1241 を米国 ATCC から輸入し、使用した。抗原は、Af株を Vero 細胞で増殖させ使用した。

(2)中和試験

チクングニヤウイルス (Af株) および Vero 細胞を用いて、プラーク減少法により測定した。

C. 研究結果

① 遷延する関節痛より確定診断に至ったチクングニヤ熱の本邦初症例について

(1 例目)

36 歳女性。主訴は遷延する膝関節痛および足関節痛。既往歴、家族歴に特記事項なし。平成 18 年 7 月 16 日より 12 月 10 日までスリランカ、コロンボに帯同家族として滞在。平成 18 年 11 月 17 日に歩行困難な程度の左足関節痛と共に 40℃の発熱、頭痛が出現。現地医療機関で白血球減少、血小板減少、臨床症状と迅速診断キットによりデング熱とチクングニヤ熱の混合感染と診断されたが、血清診断による確定診断はなされなかった。無治療にて 11 月 18 日には解熱し、11 月 19 日に両四肢に紅斑が出現した。関節痛はその後も持続し改善を認めないため、精査目的で 12 月 26 日に国際医療センターを受診した。日常生活に支障を来たすほどではない関節痛であったため無投薬にて経過観察としたが、その後の血清診断の結果、抗チクングニヤウイルス IgM 抗体陽性 (Positive/Negative ratio=7.04, P/N Ratio 2.0 以上を陽性) および抗チクングニヤウイルス中和抗体価 640 倍 (10 倍以上を陽性) を確認した。患者は 1 月初旬にスリランカへ戻ったため抗体価推移の検査は実施できなかった。

② 本邦で初めてウイルスが分離されたチクングニヤ熱輸入症例について (2 例目)

患者は、50 代、女性。日本在住の日本人女性。平成 18 年 1 月 27 日から 1 月 31 日まで、スリランカに渡航。スリランカでは、渡航後まもなく、数ヶ所を蚊に刺された。帰国後の 1 月 4 日より全身倦怠感が増悪し、1 月 5 日に 40 度の発熱、関節痛を認め、日本国内の医療機関に受診し、入院した。入院中に鼻出血、皮疹の症状も出現した。対症療法を行い、症状は改善して退院した。国立

感染症研究所における抗体検査の結果、デングウイルス感染は否定された。チクングニヤウイルス遺伝子の検出同定、ウイルス分離及び同ウイルスに対する特異的 I g M抗体陽性、中和抗体陽性であり、チクングニヤ熱と確定診断した。患者は、退院後は軽度の全身倦怠感が残存していたが、後遺症なく回復している。本症例の抗体検査結果は以下の如くである。

(1)抗チクングニヤウイルス IgM 抗体

急性期血清：陰性

Positive/Negative Ratio=1.14

回復期血清：陽性

Positive/Negative Ratio=3.44

(P/N Ratio 2.0 以上を陽性とする)

(2)抗チクングニヤウイルス中和抗体価

急性期血清 10 倍以下

回復期血清 20 倍

(10 倍以上を陽性とする)

また、分離ウイルスの遺伝子解析結果から、インド洋の島国レユニオン島の流行で分離されたウイルス株と 99%一致した。

D. 考 察

2005 年初頭にコモロ (Comoro) 諸島で端を発したチクングニヤ熱は、インド洋に位置する他の島国 (モーリシャス : Mauritius, レユニオン : Reunion, セーシェル : Seychelles, マヨット : Mayotte) などに拡大し流行した。この流行はかなり大きな規模の流行であり、人口 77 万人のレユニオン島では 26 万 4 千人が感染したと推計され、237 人が死亡した。そして 2006 年にはインド西部、スリランカでも流行をみており、香港、スイス、台湾、米国などからも輸入症例が報告されている。

今回、2 例目の患者血清からチクングニヤウイルスが分離された。本血清は、新潟県保健環境科学研究所で 2 ヶ月近く保存されていたものであるが、比較的容易に分離されたことから、血清中のウイルス力価はかなり高いものであったと推測された。分離ウイルスの遺伝子解析結果から、インド洋の島国レユニオン島の流行で分離されたウイルス株と 99%一致した。このことから、スリランカで流行しているチクングニヤウイルスはインド洋の流行から持ち込まれたウイルスであることが確認された。本症例のウイルス血症が確認された時期は 12 月であり、沖縄以外、我が国でのヒトスジシマカは卵のステージで越冬しており、ヒト→蚊→ヒトの流行が起こる可能性はなかった。しかし、チクングニヤ熱患者ではその急性期のウイルス血症はデング熱よりも高いとする報告もあり、ヒトスジシマカが活動する夏期にチクングニヤ熱の患者が確認された場合には、デング熱と同様に媒介蚊対策を考慮する必要がある。

また、世界的に話題となった今回のチクングニヤ熱流行のような大規模の流行で、海外でも輸入症例に関する報告がされ、ヨーロッパ・米国・東南アジア諸国では非常に警戒されている状況では、わが国も決して例外ではなく、輸入症例に備えて診断体制を整えておくことが重要であることが示唆された。チクングニヤ熱は感染症法や検疫法に規定されていないことが現状であるが、今後の南アジア、東南アジアでの流行状況に応じて法的整備も考える必要があると思われる。

E. 結 論

2005 年から、インド洋の島国で大きな流行をきたしたチクングニヤ熱は、2006 年に

はそのウイルスが、インドおよびスリランカに侵入し流行をきたした。わが国でもスリランカからの輸入チクングニヤ熱症例 2 例を確認した。また、2 例目の患者血清からチクングニヤウイルスを分離した。

F. 健康危険情報

インド洋諸国、インドおよびスリランカで流行しているチクングニヤ熱の輸入症例 2 例を確認した。両症例ともスリランカからの輸入症例であった。

G. 研究発表

1. 論文発表

水野泰孝、加藤康幸、工藤宏一郎、高崎智彦、倉根一郎. 遷延する関節痛より確定診断に至ったチクングニヤ熱の本邦初症例. 感染症学雑誌 (in submission) 2007.

2. 学会発表

高崎智彦、林昌宏. チクングニヤウイルス感染症の実験室診断法. 平成 18 年度希少感染症診断技術研修会. (東京) 2007 年 2 月.

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

日本脳炎ウイルスにおける Genotype shift の生物学的意義

分担研究者 倉根 一郎（国立感染症研究所ウイルス第一部 部長）
研究協力者 貫井 陽子（国立感染症研究所ウイルス第一部二室 流動研究員）
田島 茂（国立感染症研究所ウイルス第一部二室 主任研究官）
根路銘令子（国立感染症研究所ウイルス第一部二室 主任研究官）
高崎 智彦（国立感染症研究所ウイルス第一部二室 室長）

研究要旨：国内で分離される日本脳炎ウイルス(JEV)は、1990 年代初頭以降 genotype 3 型から 1 型へと変化している。このような genotype shift が JEV の感染環、病原性に与える影響について解明することを目的に今回新たに JEV genotype 1 型完全長 cDNA クローンを構築した。また構造蛋白領域を genotype 3 型代表株に置換したキメラウイルスを作製し、哺乳類、神経系細胞内での増殖能の検討及びマウスでの感染実験を行った。哺乳類、蚊由来の細胞での増殖は genotype 1 型が最も優れていた。また genotype 3 型構造蛋白/1 型キメラの方が genotype 3 型ウイルスよりも増殖が優位であった。一方、神経系由来の細胞では 3 型の増殖能が優位であった。またマウスの感染実験においても 3 型及び 3 型構造蛋白/1 型キメラの病原性は 1 型と比し有意に高い傾向が確認された。これらの結果より JEV の構造蛋白領域（特に E 蛋白）が哺乳類、蚊細胞内での増殖性や神経細胞内での増殖性を規定することが明らかとなった。また genotype 1 型株の方が感染環を形成する哺乳類細胞での増殖に優れており、genotype shift に影響している可能性が示唆された。また genotype shift と病原性低下との関連も示唆された。

A. 研究目的

日本脳炎ウイルス(JEV)は遺伝子解析より 5 つの genotype に分類される。日本では 1990 年以前の分離株は genotype 3 型が主流であったが、近年の分離株は genotype 1 型へと変化しており、同様の現象はベトナム、韓国などでも観察される。また我々は近年分離された genotype 1 型株のマウスでの神経毒性を評価しているが、その結果 genotype 1 型株のほとんどは genotype 3 型と比し病原性が低下していることがわかった。そこで我々は genotype shift がなぜ生じたのか、病原性との関連はあるのか、細胞内での増殖性や病原性を規定する遺伝

学的領域を解明することを目的とした。

B. 研究方法

今回新たに JEV genotype 1 型完全長 cDNA クローンを作製した。cDNA クローンを作製する際の親株は、当研究室においてブタ血清より分離された JEV Mie41/2002 株を用いた。ウイルス cDNA は 4 つの領域に分けて PCR で増幅した(図 1)。4 つの断片を 1 つのプラスミドベクターに順次連結し、最終的に完全長の日本脳炎ウイルス genotype 1 型をコードする cDNA クローンを構築した。次にウイルス cDNA の 3'末端に付加した制限酵素 Nsi I

部位一箇所をプラスミドベクターを切断して直鎖上にした後、5'末端の上流に付加したT7プロモーターからin vitroで転写反応を行い、完全長ウイルスRNA(プラス鎖)を得た(図2)。次にリボソーム試薬を用いてVero細胞にRNAを導入し7日後に培養上清を回収した。またこの組換えウイルスクローンをを用い構造蛋白領域をGenotype 3型のNakayama株、Beijing-1株に置換したキメラウイルスを作製し、哺乳類、蚊、神経系細胞での増殖能やマウスでの病原性につき解析を行った(図3)。

C. 研究結果

今回新たにJEV genotype 1型完全長cDNAクローンの作製及びウイルス産生系の確立に成功した。得られたウイルス液の感染力価は 2.0×10^6 /mLと高力価を示した。ウイルス液からウイルスRNAを回収し、全塩基配列を決定したところ、親株と完全に一致した。またVero細胞に接種し形成させたプラークの大きさも親株と同等であった。

次にgenotype 1型/3型キメラウイルスの検討を行った。図4にVero細胞でのプラーク形態の比較と増殖曲線を示す。プラークサイズはgenotype 3型と比し1型で著明に大きく、増殖速度も速い傾向が認められた。また3型と比し3型構造蛋白/1型キメラの方が増殖は有利であった。この傾向は増幅動物であるブタ細胞を用いた場合も同様であった(図5)。またベクターである蚊細胞内での増殖も図6に示すように1型で有利であった。一方、病原性に関与していると考えられる神経系細胞内での増殖は3型及び3型/1型キメラの方が優位であった(図

6)。また3週令のDDYマウスに各々のウイルスを 1×10^3 pfuずつ腹腔内接種し病原性を評価したところ図7に示すように1型では70%のマウスが21日間の観察期間において生存していたが、3型では10%、E蛋白キメラでは20%、構造蛋白キメラでは0%の生存率を呈しており $p=0.001$ と有意に病原性において差異を認めた。また神経学的症状も1型では後肢の弛緩性麻痺を呈することが多いが、一方3型、3型/1型キメラではそのような麻痺を呈さず、体重減少や異常興奮を呈し死亡するものがほとんどであった。

D. 考察

今回の検討よりJEVの構造蛋白特にE蛋白がウイルスの哺乳類細胞内での増殖や病原性を規定する主要な領域であることが示唆された。また非構造蛋白や非翻訳領域も関与している可能性が示唆された。また近年国内で分離される主要な株である1型の方が哺乳類由来の細胞や蚊由来の細胞内での増殖が優位であった。一方、神経細胞内での増殖は3型、3型/1型キメラの方が優位であった。またマウスへの病原性も3型、3型/1型キメラの方が有意に高いことが判明した。これらの結果から1型の方が感染環を形成する哺乳動物内で優位に増殖していることが示唆され、これがgenotype shiftと関連があるとも考えられる。またマウスでの病原性については1型の方が著明に低下しているため、これは近年のJEV患者数の低下との関連も示唆される。しかしながら、今回用いた3型の株はマウス脳での多経代を経たものであり、本来のウイルス特性と乖離している可能性も否定できない。

よって次年度はより genotype shift 直前に分離された 3 型株を用いて検討を行う予定である。また 1 型、3 型では神経症状にも大きな差異があるためこれらの責任病巣につき今後病理学的検討を行う。今後も日本脳炎患者数やブタの JEV 抗体保有率、蚊よりの JEV 分離などにより更にサーベイランスを進め genotype shift につき詳しく解析を行う必要がある。

E. 結論

JEV の genotype shift は宿主細胞内での増殖性などに起因する可能性が示唆された。また病原性への関与も示唆された。また病原性を規定する主要な因子は E 蛋白であることが判明した。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Hamano M, Lim CK, 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. *Epidemiol. Infect.*(2006) 1-4.

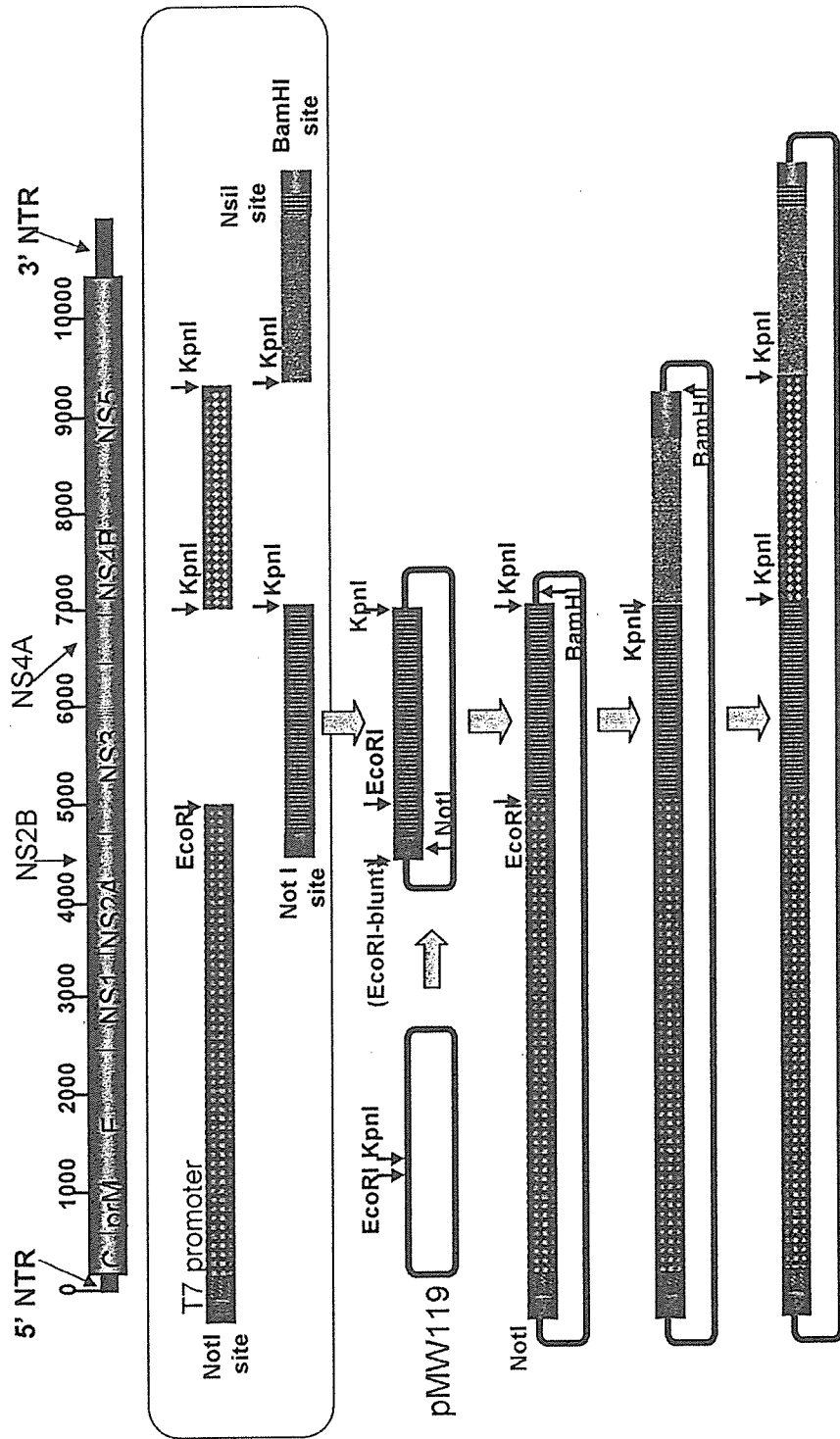
2. 学会発表

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 クロー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、平成 18 年 11 月 19 日、名古屋市。

貫井 陽子、田島 茂、林 昌広、根路銘令子、高崎 智彦、倉根 一郎：日本脳炎ウイルス Genotype shift の生物学的意義。第 81 回 日本感染症学会総会、平成 19 年 4 月 11 日、京都市。

H. 知的財産権の出願・登録状況
特になし

図1 JEV(Mie/41/2002) clone構築の概略図



rJEV(Mie/41/2002)/pMW119

図2 完全長cDNAクローン由来組換えウイルスの産生

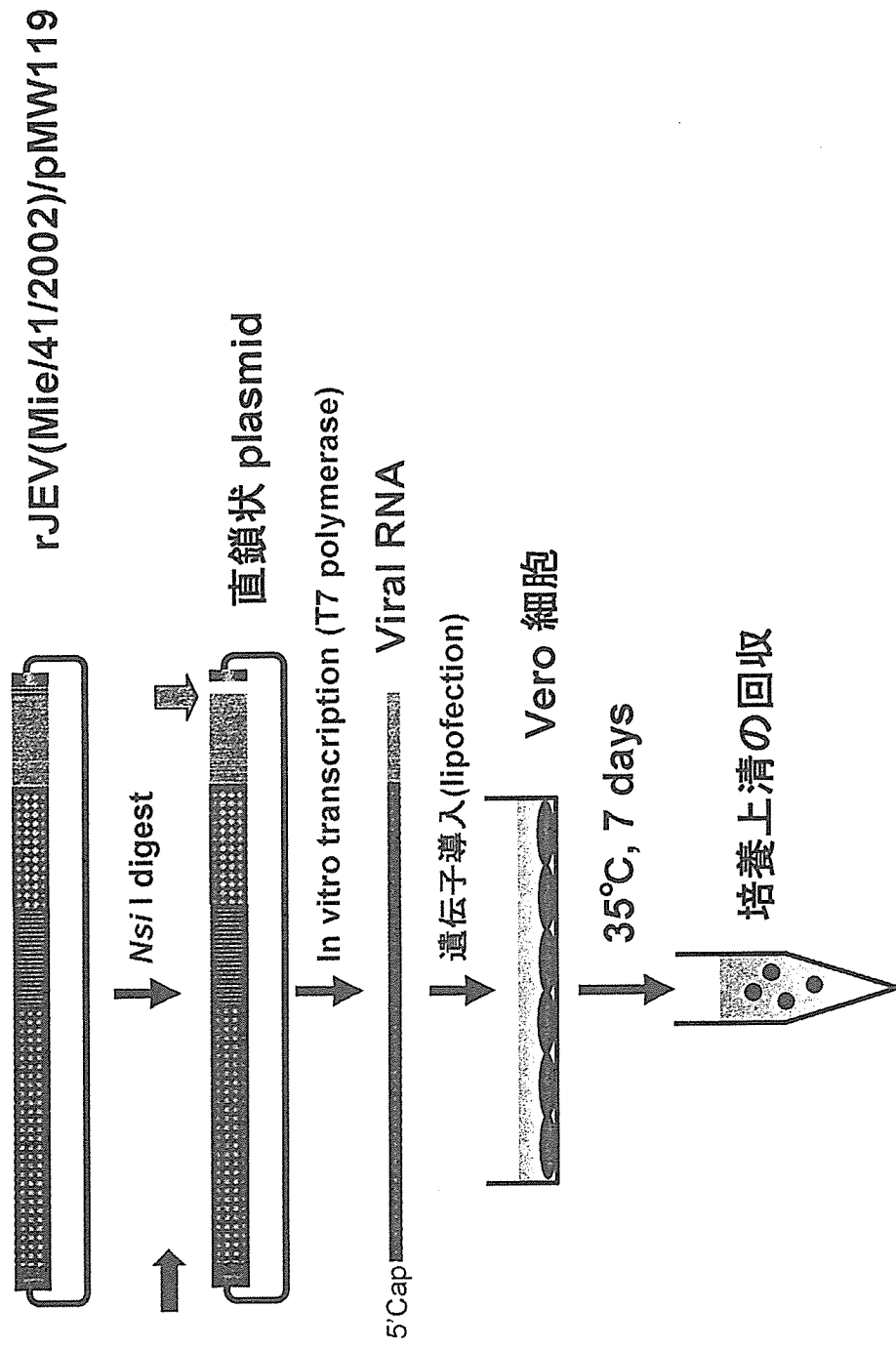


図3 Genotype 1型/3型 キメラクローンの構築

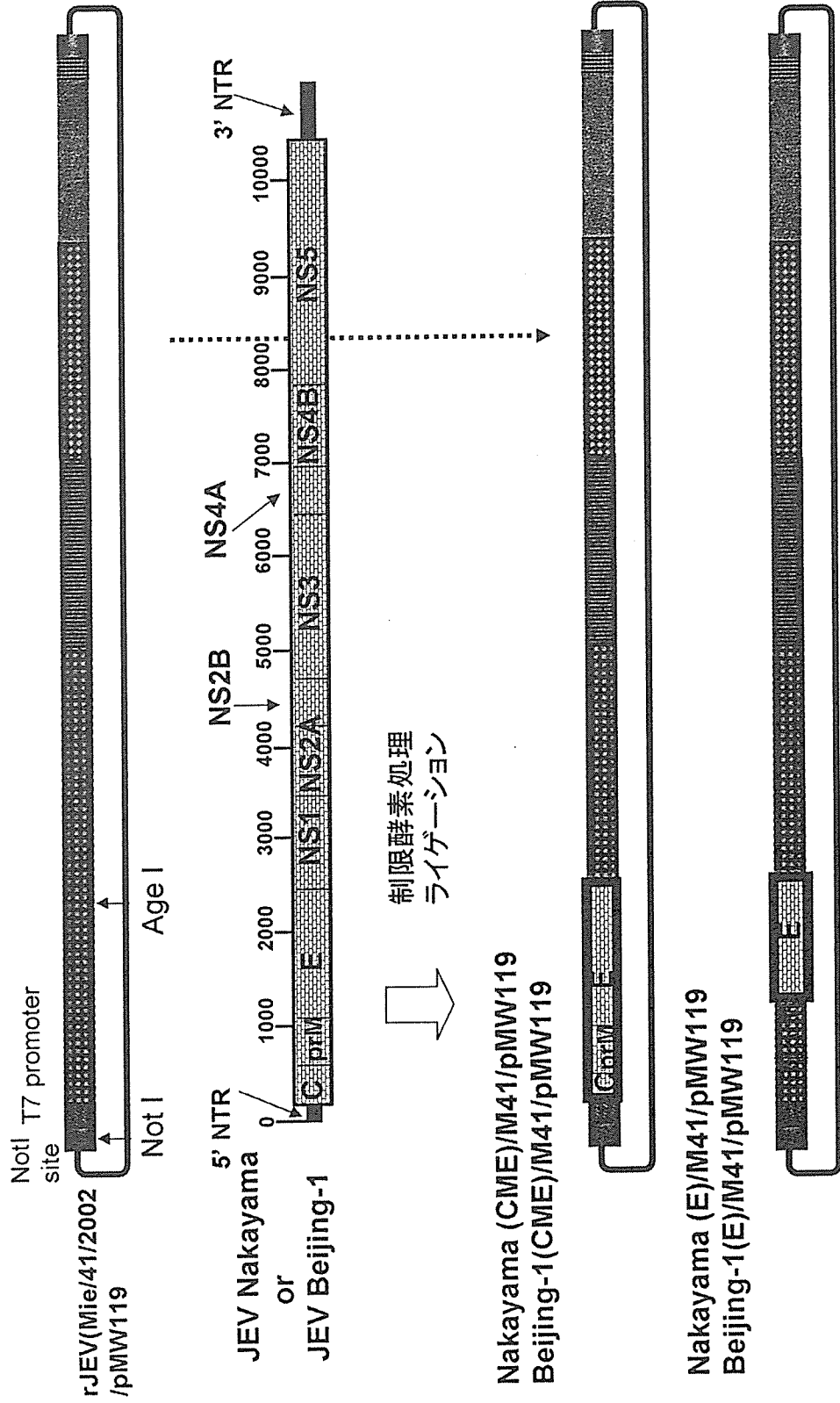


図4 Vero細胞上でのプラーク形態、増殖曲線

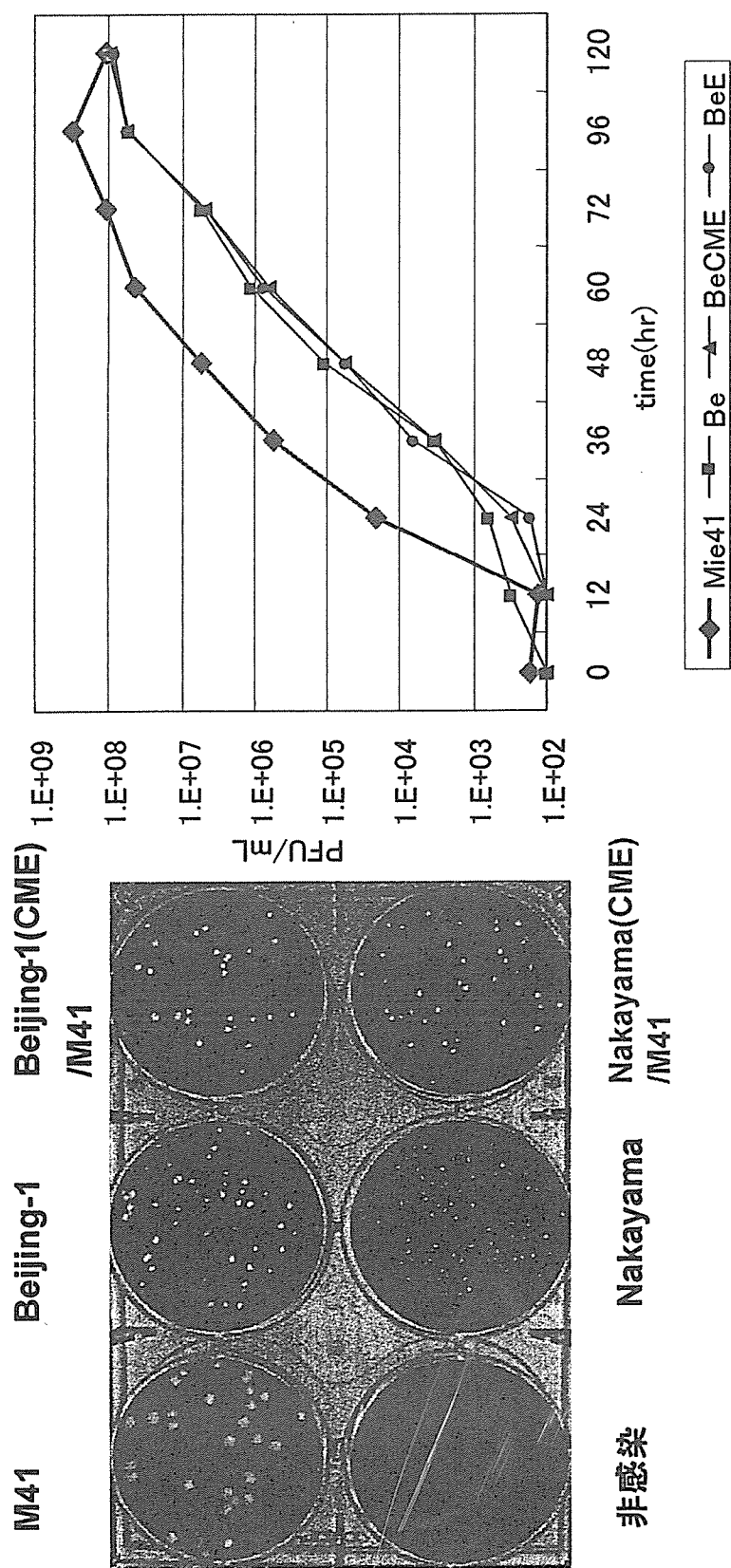


図5 PK15(ブタ腎)細胞上でのプラーク形態、増殖曲線

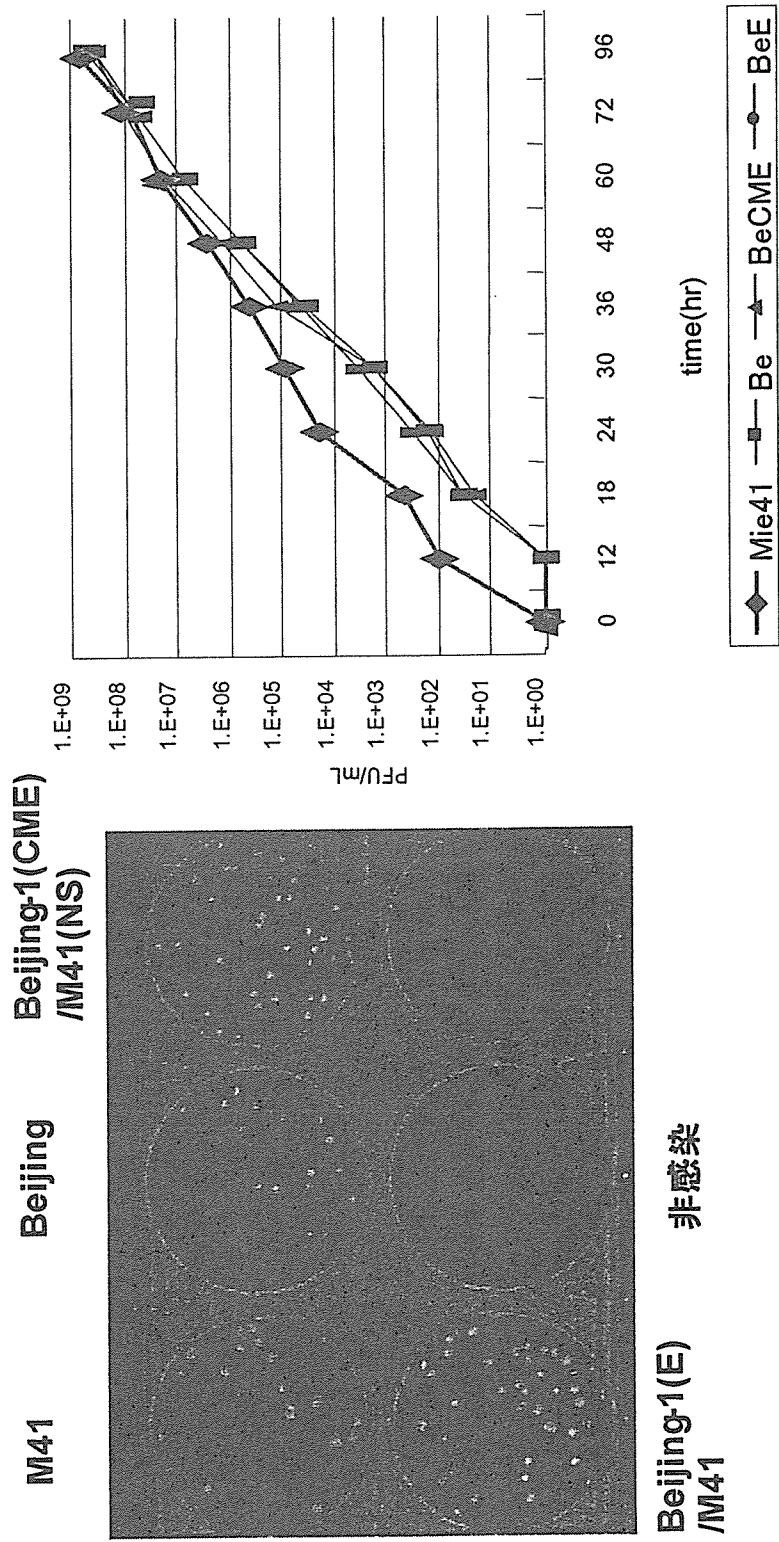


図6 神経系細胞、蚊細胞の増殖曲線

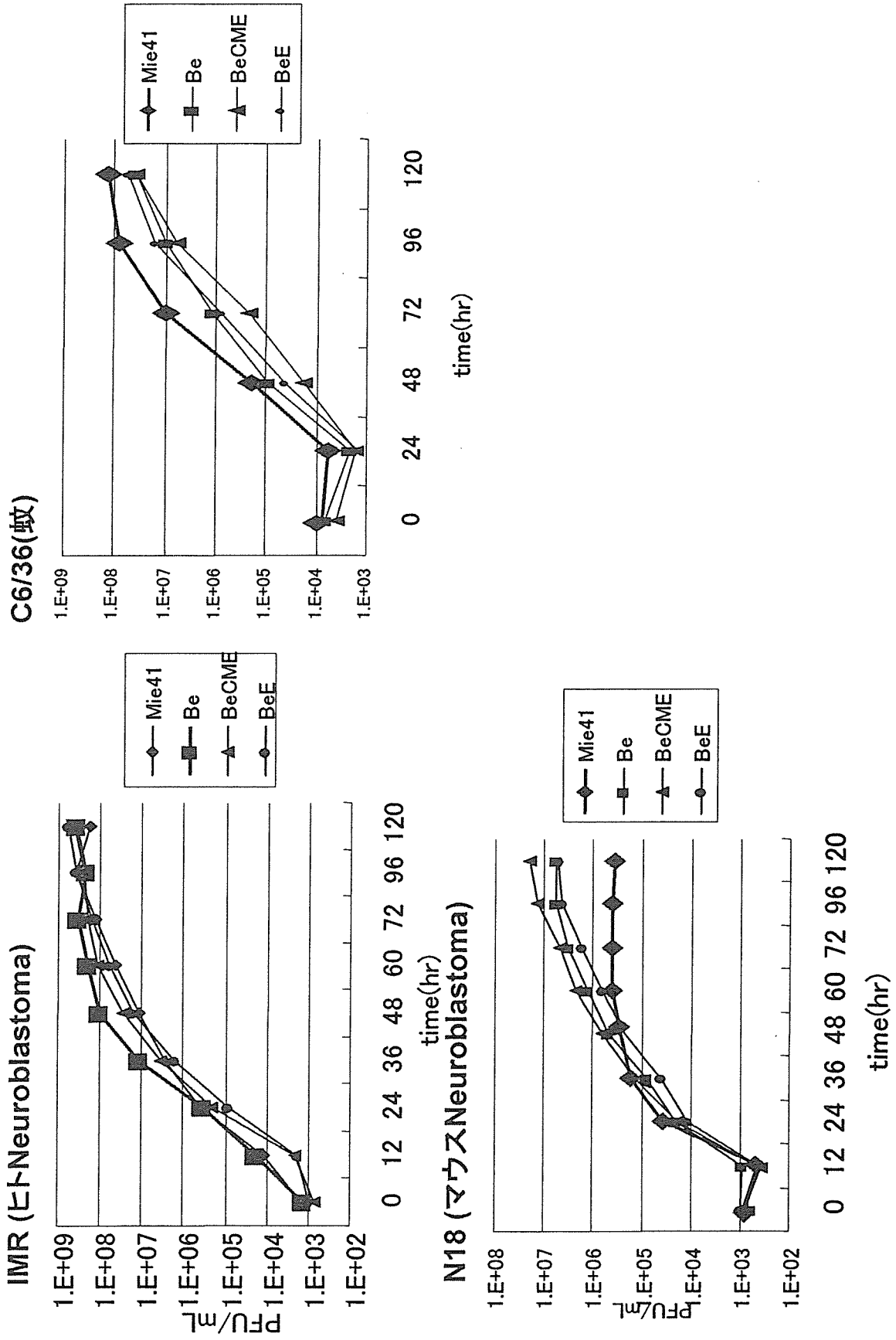
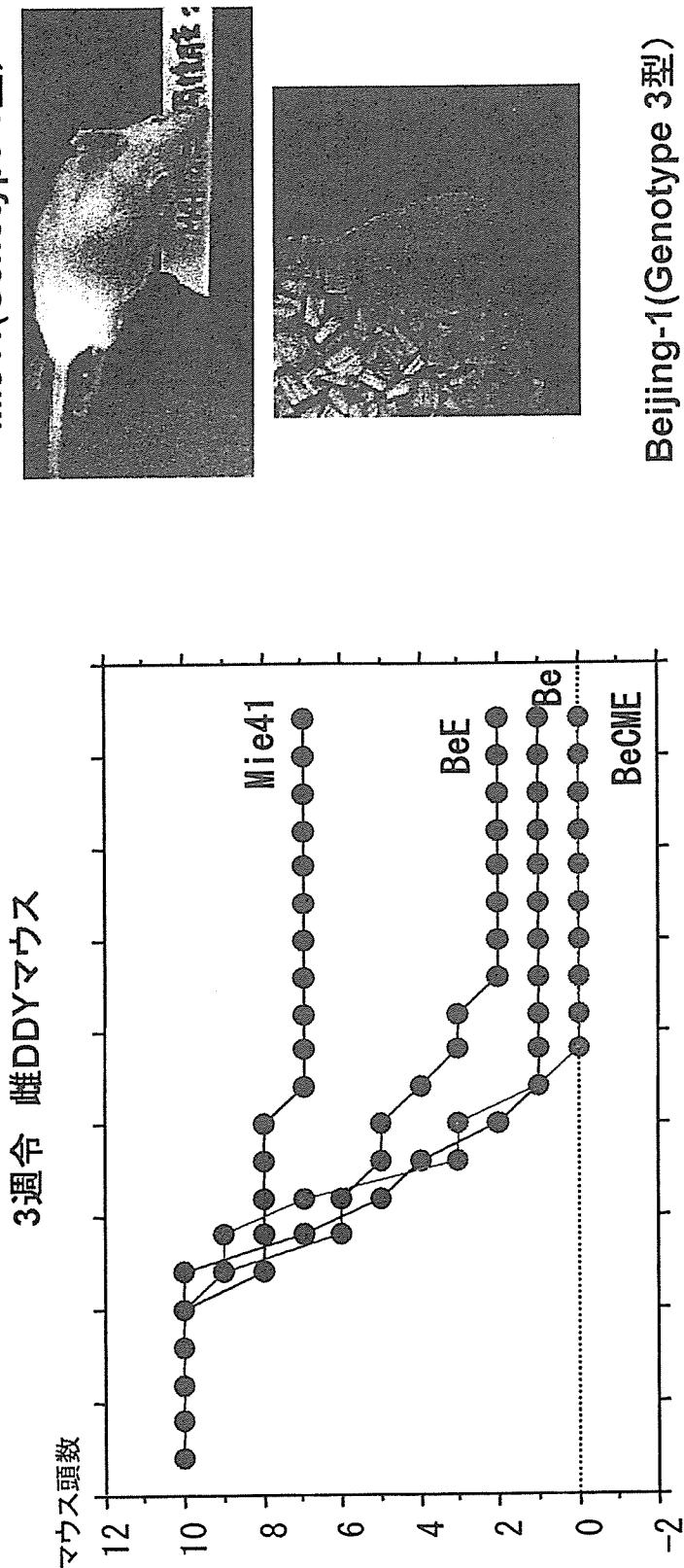


図7 マウスでの病原性解析



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

ウエストナイルウイルス及び日本脳炎ウイルスモデルを用いた低ドーズ DNA ワクチンの
中和抗体誘導能に関する研究

分担研究者 小西英二 神戸大学・助教授
研究協力者 高崎智彦 国立感染症研究所・室長
近藤高志 日本中央競馬会競走馬総合研究所・研究役

DNAワクチンは種々の利点を持つ次世代ワクチンとして開発が進められているが、問題は遺伝子組換え製剤に対する人々の懸念である。解決策として、ドーズの低減が挙げられる。我々はこれまで蛋白混合投与法や針無投与法がDNAワクチンの効果を高めることを報告してきた。今回、ウエストナイルDNAワクチン (pcWNME) と日本脳炎DNAワクチン (pNJEME) を用いて、低ドーズにおける中和抗体誘導能を調べた。その結果、市販のウエストナイル不活化ワクチンの1/10ドーズを混合した時、0.1 µgのpcWNMEは、1回の接種でマウスに中和抗体を誘導した。マウスを用いるDNAワクチンの初期評価には通常100 µgを複数回投与するので、大幅なドーズ低減が可能であることを示す。また、市販の日本脳炎不活化ワクチンの1/100ドーズを混合した時、1 µgのpNJEMEは、1-2回の接種でブタに中和抗体を誘導した。大動物に通常用いられるDNAワクチンのドーズは数百µgから数mgであり、今回の結果は、大動物においても投与法の工夫によりDNAワクチンのドーズを格段に低減できることを示す。

A. 研究目的

節足動物媒介性フラビウイルスには、地球規模の分布域をもちヒトに重篤な疾患を引き起こすものが多い。ウエストナイルウイルス (WNV) は熱帯・亜熱帯のみならず温帯地域に、また日本脳炎ウイルス (JEV) はアジアの広い地域に存在する。いずれも分布域は拡大している。わが国にとって、WNVは新興感染症に、JEVは再興感染症の原因になりうる病原体である。

これらの病気を予防するために、ワクチンは最も普遍的な手段である。節足動物媒介性フラビウイルスに対しては、認可ワクチンの入手できないものが多いが、入手できるものでも改良が望まれている。特に、国際的視野に立ち病気を予防するためには、それに適したワクチンを開発する必要がある。

DNAワクチンは、安全・安価な次世代ワクチンとして開発されてきた。先進国はもとより開発途上国にも導入可能で、地球規模で病気を予防するために適している。これまで多くの臨床試験が行われてきたが、

動物用には昨年米国でウエストナイルDNAワクチンが認可されたものの、ヒト用には未だ認可されたものはない。ブレーキの1つになっているのは、遺伝子組換え製剤に対する人々の懸念である。

マウスを用いたDNAワクチンの初期評価には100 µgを複数回投与するのが通常のプロトコルであり、一方臨床試験や大動物を対象とした評価に用いられるDNAワクチンのドーズは数百µgから数mgである。したがって、今後ヒト用DNAワクチンが認可されるためにはドーズの低減が必要である。

これまで我々の教室では、DNAワクチンと蛋白ワクチンを同時投与することにより、また針無投与法により、DNAワクチンの効果を高めることを報告してきた。さらに、この2つの工夫を組み合わせ、DNA/蛋白混合液を針無投与することにより、DNAワクチンの効果を格段に高めることを示した（平成17年度本事業「節足動物媒介性ウイルスに対する診断法の確立、疫学及びワクチン開発に関する研究」研究報告書『タン

パクワクチンとの混合投与による Dengue 4 価 DNA ワクチンのマウスにおける中和抗体誘導能の上昇)]。本研究では、ウエストナイル DNA ワクチンをマウスモデルで、また日本脳炎 DNA ワクチンをブタモデルを用いて、低ドーズにおける中和抗体誘導能を調べた。

B. 研究方法

ウイルス：ウエストナイルウイルス (WNV) Eg101株及び日本脳炎ウイルス (JEV) 中山株を、DNAワクチンの作製、中和試験及び赤血球凝集抑制 (HI) 試験に用いた。

免疫原：ウエストナイルDNAワクチン (pcWNME) は、WNVのprM/E遺伝子を pcDNA3ベクター (インビトロジェン社) に組み込み作製した。また、日本脳炎DNAワクチン (pNJEME) は、JEVのprM/E遺伝子を pNGVL4aベクター (ミシガン大学ベクターコアから分与：現在 pUMVC4a) に組み込み作製した。一方、蛋白ワクチンとして、市販の日本脳炎不活化ワクチン (JEVAX；武田製薬) 及びウエストナイル不活化ワクチン (WNVAX；フォートドッジ社) を用いた。なお、pNGVL4aベクターの作製には、ミシガン大学が NIH grant#U42RR11149の補助を受けた。

マウス実験：4-5週齢のマウス (ICRまたは ddY 系統) に、pcWNME と WNVAX を混合して、または単独で、麻酔下で大腿部内側に投与した。投与にはジェット式針無注射器 (島津製作所) を用いた。投与後3週間隔で採血し、血清を中和試験に供した。

ブタ実験：4週齢のブタ (クラウンミニ系) に、pNJEME と JEVAX の混合液を麻酔下で針無注射器を用いて、大腿部内側あるいは耳根部に投与した。投与後、1週間隔で採血した。また、大腿部内側に投与した場合は、初回免疫後7週目に初回免疫と同量の DNA/蛋白で追加免疫を行った。

中和試験：中和抗体価は90%プラーク減少法により求めた。

HI試験：Clarke と Casals 法のマイクロ変法を用いた。

密度勾配遠心：10-40%の蔗糖密度勾配液上に重層して超遠心後、20分画を得た。

2-メルカプトエタノール (2-ME) 処理：

血清に等量の0.1M 2-MEを加え、37°Cで1時間処理した。

(倫理面への配慮)

本研究における動物実験は、神戸大学大学院医学系研究科動物実験委員会により承認された。

C. 研究結果

マウスに中和抗体を誘導する pcWNME のドーズ：1 µg あるいは 0.1 µg の pcWNME を 1/10 ドーズの WNVAX と混合して ICR マウスに投与した (表1)。対照として単独投与群を設けた。CpG アジュバントの量を揃えるために、WNVAX の単独投与群には pcWNME と同じモル数の空ベクター (pcDNA3) を加えた。1 µg 投与群の6週目と9週目における中和抗体価は、混合投与群が単独投与群より有意に高かった。この結果は DNA と蛋白の相乗効果を示す。0.1 µg 投与群では、この相乗効果は 1 µg 投与群のように明確ではなく、6週目にのみ認められた。一方、HI試験では全体に中和試験より高い抗体価を示し、3週目より抗体価が検出された。そして、1 µg 投与群において中和試験と同様の相乗効果が示された。

次に ddY マウスに、0.1 µg あるいは 0.01 µg の pcWNME を 1/10 ドーズの WNVAX と混合して投与した (表2)。中和及び HI の両試験において、0.01 µg 投与群では相乗効果を認めなかった。しかし、0.1 µg 投与群では ICR マウスと同様に明確ではなかったが、投与後9週目に相乗効果が示された。

対照の WNVAX 単独投与群には pcDNA3 を混合し、真の意味の単独投与ではなかったが、0.0073 µg の pcDNA3 を混合投与したときに、検知できる中和抗体を誘導しなかったため (表2)、真の単独投与では 1/10 ドーズの WNVAX は中和抗体を誘導できない量であると考えられる。また、0.1 µg の pcWNME 単独でも中和抗体を誘導しなかった。以上の結果は、0.1 µg の低ドーズ DNA でも、1/10 ドーズの WNVAX と混合投与したとき、中和抗体を誘導したことを示す。

ブタに中和抗体を誘導する pNJEME のドーズ：ブタの大腿部内側に針無注射器を用いて pNJEME と JEVAX を混合投与した後の中和抗体価及び HI 抗体価の推移を図1に示す。100 µg の pNJEME と 1/10 ドーズ

のJEVAXを投与した個体では、初回免疫後2週目に、1:20の中和及びHI抗体価を誘導し、7週目までの持続が認められた。一方、1 µgのpNJEME と1/100ドーズのJEVAXの投与個体では、初回免疫後5週目に、1:10のHI抗体価を示したが中和抗体価は検知レベル未満であった。2回免疫後1週目においては、両個体とも、1:80-1:160の高い中和抗体価、及び1:160-1:320の高いHI抗体価を示した。

ブタの耳根部に投与した後の中和試験の結果を図2に示す。この実験では、100 µgのpNJEME と1/10ドーズのJEVAX、10 µgのpNJEME と1/100ドーズのJEVAX及び1 µgのpNJEME と1/100ドーズのJEVAXを混合投与した。いずれの個体も、初回免疫後1週目に1:80-1:160の高いレベルの中和抗体価を示し、免疫後5週目まで持続した。

ただし、この実験ではワクチン投与前の血清中に、70%プラーク減少法で捉えられる少量の移行抗体が3頭共に認められた。90%プラーク減少法により免疫後1週目以降に示された高い中和抗体価が、ワクチン接種により誘導されたものかどうかを調べるために、免疫後1週目と5週目の血清を用いて、密度勾配遠心法によりIgMとIgGに分離後、それぞれの中和抗体価を測定した(表3)。その結果、免疫後1週目にはIgM抗体、免疫後5週目にはIgG抗体が主体であることが確認された。さらに、免疫後1週目と5週目の血清を2-ME処理して、HI抗体価を求めた(表4)。その結果、免疫後1週目の血清のみに2-ME処理によるHI抗体価の有意な減少が示されたことから、免疫後1週目における高い抗体価の誘導は、主にIgM抗体によることが確認された。この結果は、図2に示した抗体価の上昇はワクチン接種により個体が初めて誘導した免疫であることを示唆する。

以上の結果より、針無注射器を用いたDNAと蛋白の混合投与方法が、マウスと同様に、ブタにおいても効果的であることが示された。

D. 考察

WNVのマウスモデルでは0.1 µg、またJEVのブタモデルでは1 µgまでドーズを低減できることが示された。通常の試験に用

いられる量の約1000分の1であり、安全性の向上と共に価格の低下につながる。遺伝子銃(ジーンガン)も低ドーズで投与できるが、比較的大掛かりな装置が必要であり、多数のヒトを対象とするワクチン接種に適用するには困難と思われる。一方、ジェット式針無注射法は、近年の針刺し事故の増加に対応するため、ワクチンに限らず一般的な薬剤投与のために開発が急速に進められてきた分野であり、簡便な装置で容易に使用できる。

今回、日本脳炎DNAワクチンは、ヒトを予防する目的でブタを対象動物とした。ブタ流産を防止するための獣医目的の予防法開発ではない。JEVは、自然界においてトリが主要なウイルス増幅動物とされるが、ヒトの住居地近辺では、ブタが効率的なウイルス増幅動物となり媒介蚊にウイルスを供給する。したがって、ブタにワクチンを接種して感受性をなくすことが、理論的にはヒトの流行をコントロールすることに貢献する。この理論は長崎県の壱岐島で、高橋らによって1967-1968年に証明されており、自然界の増幅動物によるウイルス生産量を減らすことにより、ヒトへの暴露量を低減させることが可能と考えられる。

現行のブタにおけるワクチンプログラムでは、防御に有効な中和抗体を誘導するためにJEVAXの2-3回の接種を必要とする。まだ予備的検討ではあるが、今回1-2回の免疫により高いレベルの中和抗体を誘導した。投与方法の工夫は、投与量の低減だけでなく、ワクチンの接種回数の減少にもつながることを示す。

大腿部にワクチンを投与したブタでは2回の投与後に抗体が誘導されたが、耳根部に投与した場合は1回の接種で誘導された。後者の実験では微量の移行抗体が検出されたため、今回の実験だけで、投与部位の違いによる免疫誘導効率の違いを結論することはできない。しかし、微量の移行抗体が効率的な抗体誘導に関係するならば、日本脳炎の流行地域では自然感染を受けたブタが多いため、出産直後の新生児ブタにワクチン接種する戦略は有効と考えられる。

E. 結論

蛋白混合投与方法により、低ドーズのDNA