

こと、(iii)キャプシド蛋白質の最も外側に位置するループ領域に変異をもつこと、などが判明した。また、一昨年、愛媛、堺、千葉で流行したウイルス株は、2006 冬期には局地的な感染に留まり、全国的な流行の原因にはなっていないことがわかった (Fig. 2)。ORF1, 2, 3 領域で系統樹解析を行なったところ、同様の結果を得た。今回、全国的な流行の原因となった株に特徴的に見られる変異をゲノム全長にわたって抽出した。キャプシド蛋白質 VP1 領域の変異を紹介する。抽出した変異を、VP1 立体構造上に表示した。キャプシドの変異は、VP1 の最も外側に位置するループ (P2 領域) に集中して生じていることがわかった (Fig. 3)。

D. 考察

系統樹解析の結果から、我が国の 2006 秋冬期シーズンにおいては、同一起源の新型ウイルス株が全国的な感染流行をひき起こした可能性が高いと推察された。このウイルス株は、ほぼ同じ時期にノロウイルスの世界的大流行 (パンデミック) を引き起こしたことになる。このウイルス株は春期にすでに日本に存在している。近縁のウイルスが、2006 秋冬期に全国の異なる地域に検出された。この感染拡大様式から推察する限りは、2006 秋冬期シーズンの全国的な流行が単一の汚染食材により生じたとは考えにくい。ヒト-ヒト、およびヒト-食材・水・環境の汚染-ヒトの経路による感染拡大が、重要な役割を果たしていることが疑われる。この仮説を支持する研究成果として、ノロウイルス感染者の一部は、感染後 2-3 日の急性感染期を過ぎた後も、数ヶ月にわたって、ウイルスを排出するという報告がある (Levett PN. *Et al*; *J Clin Microbiol.* 1996 Jun;34(6):1497-501, Nilsson M. *et al*; *J Virol.* 2003 Dec;77(24):13117-24.)。さらに、ノロウイルスに感染しても、不顕性感染が 1-2%認められるとの報告もある (Marshall JA *et al*; *Public Health.* 2004 Apr;118(3):230-3.)。我々は、これまで考えられていたよりもはるか

に高頻度に、ノロウイルスに接触しているのかもしれない。

今回の株に特徴的なキャプシド蛋白質 VP1 領域の変異は、ウイルス増殖能を変化させるかもしれない。今のところは、ウイルス増殖系が無いために、ゲノム変異の意味について決定的な結論は出せない。しかし、日々蓄積するノロウイルスのウイルス学情報と計算機を用いた蛋白質の構造・機能変化の解析をもとに、変異がウイルスの変化に及ぼす影響をある程度正確に推測することは可能と考えている。

E. 結論

今回の解析により、我が国の 2006 秋冬期シーズンでは、単一起源の株が数ヶ月をかけて日本全国に広がっていったことが明らかになった。この株は、キャプシド蛋白質 VP1 の最も外側に位置するループ領域に複数の変異をもつ。したがって、免疫感受性や細胞指向性が、従来の流行株とは異なるかもしれない。我々が常時ノロウイルスに暴露されているとすれば、キャプシド蛋白質の変化により免疫感受性が低下した変異株が、ヒト集団での感染拡大に有利と考えられる。VP1 P2 領域が再び変化した新型ウイルスが、次の流行を引き起こすのかどうか、を検討する必要があるだろう。そこで、引き続きノロウイルスのゲノム情報の変化を追跡していきたい。ゲノム解析情報と、日々進展するノロウイルスの生物学情報を解析することにより、ノロウイルス感染症の流行発生のメカニズムについて理解を深めたい。そして、得られた知見をノロウイルス感染症の対策に役立てて行きたい。

謝辞

糞便試料の収集に、以下の先生にご協力いただきました。厚く御礼申し上げます。

吉澄志磨先生 (北海道立衛生研究所)、三上稔之先生 (青森県環境保健センター)、斉藤博之先生 (秋田県健康環境センター)、植木洋先生

(宮城県保健環境センター)、滝澤剛則先生(富山県衛生研究所)、小林慎一先生(愛知県衛生研究所)、田中智之先生、内野清子先生(堺市衛生研究所)、野田衛先生(広島市衛生研究所、現；国立医薬品食品衛生研究所)、近藤玲子先生(愛媛県立衛生環境研究所)、船津丸貞幸先生(佐賀県衛生薬業センター)、松岡由美子先生(熊本市環境総合研究所)

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1.論文発表

- 1) Motomura, K., Chen, J., and Hu, W.-H. ; Genetic recombination between human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) and HIV-2, two distinct human lentiviruses. J. Virol. 82 : 1923-1933, 2008
- 2) 本村和嗣, 岡智一郎, 中村浩美、守宏美、Hansman Grant, 横山勝, 片山和彦、神田忠仁、武田直和、佐藤裕徳 “2006 秋冬期シーズンに流行したノロウイルス GII/4 株のゲノム解析” ; 病原体微生物情報(IASR) 10 月号 p3-p4, 2007
- 3) 本村和嗣, 岡智一郎, 佐藤裕徳 “2006 年に我が国に流行したノロウイルス GII/4 株のゲノム解析” ; 食品衛生研究 11 月号 p19-p26, 2007
- 4) 2007 年 8 月 18 日 ; 産経新聞 朝刊「昨年 全国で流行ノロウイルス ; 欧州と同じ新型」
- 5) 2007 年 9 月 12 日 ; 読売新聞 朝刊「昨冬 流行 ノロウイルス新型だった」
- 6) 2007 年 11 月 25 日 ; 読売新聞 朝刊「感染症 国境なき拡大」

2.学会発表

- 1) 本村和嗣、Jianbo CHEN, Wei-Shau HU, “HIV-1とHIV-2のゲノム組換え効率の解析”, 第81回感染症学会総会: 京都(2007.4)
- 2) 本村和嗣, 岡智一郎, Hansman Grant, 横山勝, 神田忠仁, 武田直和、佐藤裕徳 “2006-2007 シーズンに流行したノロウイルスのゲノム解析”, 衛生微生物技術協議会第 28 回研究会: 岡山(2007.7)
- 3) 本村和嗣, 岡智一郎, 中村浩美、守宏美、Hansman Grant, 横山勝, 片山和彦、神田忠仁, 武田直和、佐藤裕徳 “2006-2007 シーズンの冬期シーズンに流行したノロウイルス GII/4 のゲノム解析”, 第 5 回感染病態研究会: 熊本(2007.9)
- 4) 本村和嗣, 岡智一郎, 中村浩美、守宏美、Hansman Grant, 横山勝, 片山和彦、神田忠仁, 武田直和、佐藤裕徳 “2006-2007 年の間に流行したノロウイルスのウイルスゲノム解析”, 第 19 回 ウイルス性下痢症研究会: 札幌(2007.10)
- 5) 本村和嗣, 岡智一郎, 中村浩美、守宏美、Hansman Grant, 横山勝, 片山和彦、神田忠仁, 武田直和、佐藤裕徳 “2006-2007 年の間に流行したノロウイルスのウイルスゲノム解析”, 第 55 回 日本ウイルス学会総会: 札幌(2007.10)

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

3. その他

Study period
May 15/2006 – Jan. 03/2007

Stool specimens

- * **55 NoV GII/4 infection cases**
- * **11 sites in Japan**
- * **5 specimens at each site**

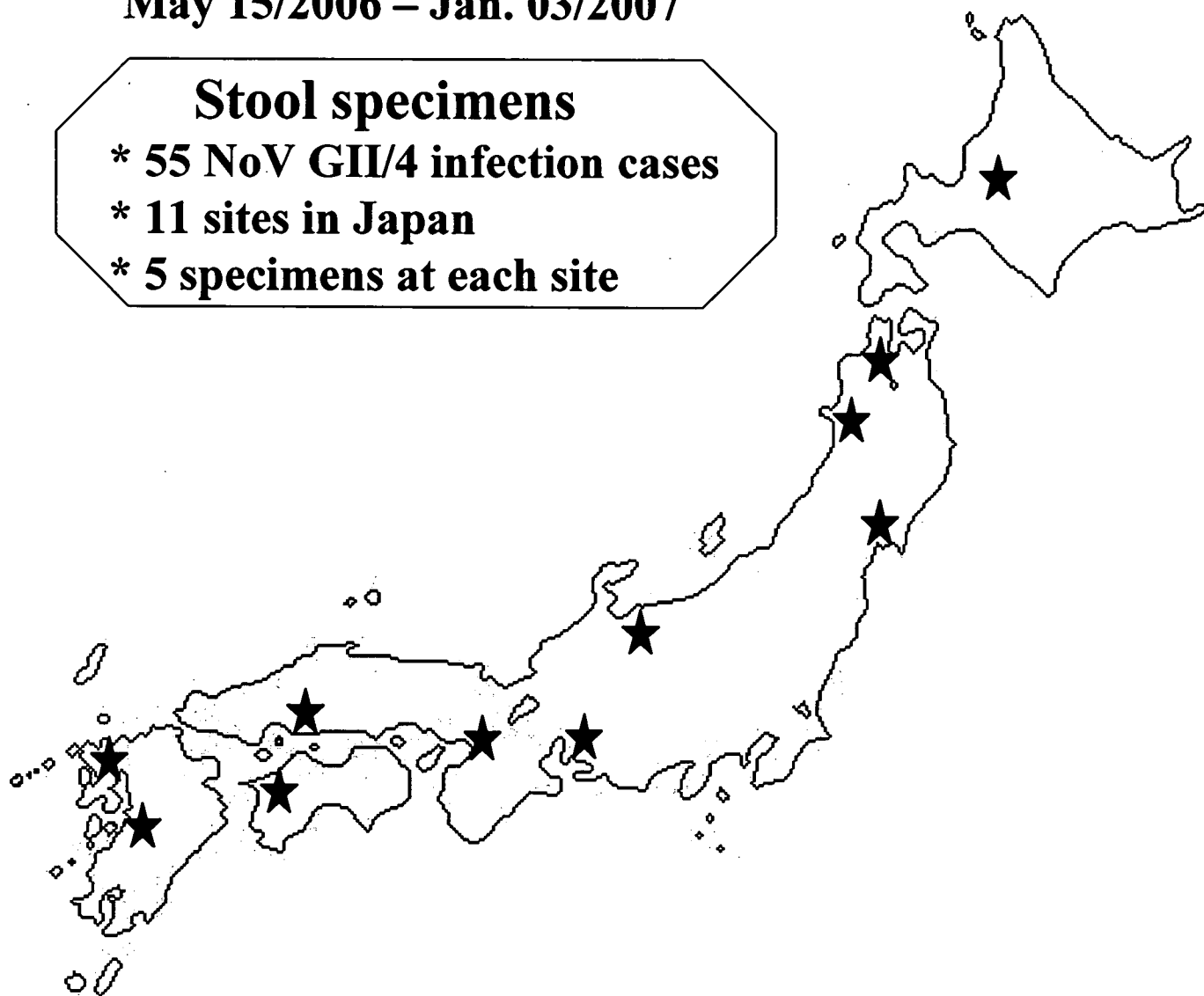


FIG. 1. A geographic locations of collecting samples are shown as star in a map. These samples from patients with gastroenteritis from 11 different regional public health institutes (five specimens from each) were collected between October 2006 and January 2007.

Phylogenetic tree analysis
Full genome (n=7568 bps)
(bootstrap value > 95)

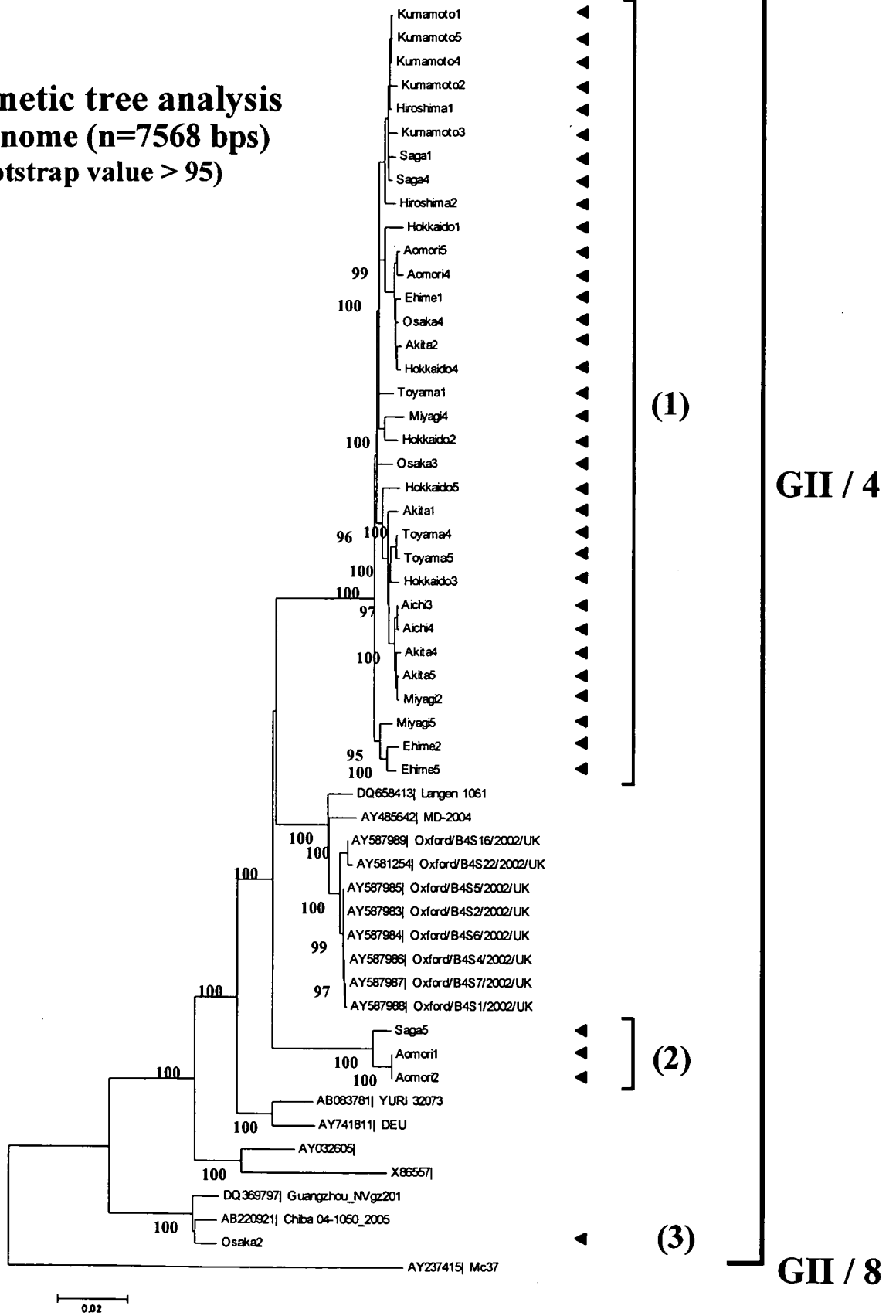


FIG. 2. The Phylogenetic trees reconstructed for full viral genome of NoV. The tree was drawn by the neighbor joining method with MEGA 3.1. The numbers on each branch indicate the bootstrap value for the clusters supported by that branch. Our specimens are shown closed triangle. Bootstrap values (> 95) are shown at corresponding nodes. Cluster numbers are named and indicated on each clusters. Accession number of each sample are indicated in the inset.

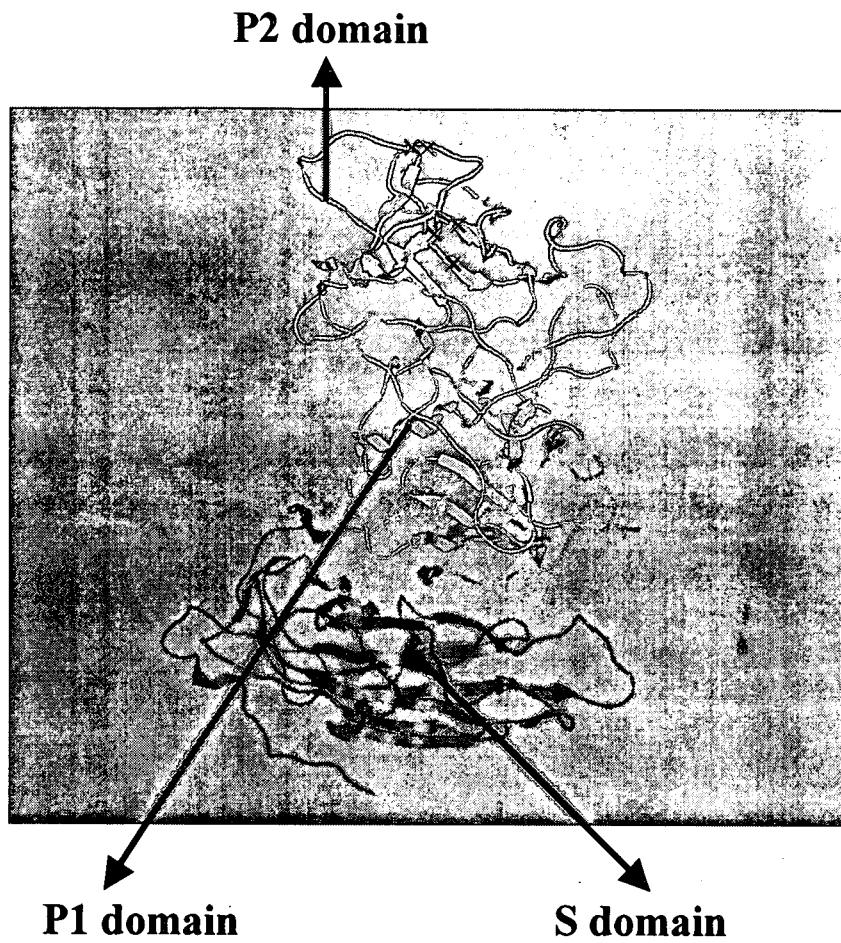


Fig. 3 Three Dimention Analysis of structural of VP1 capsid. The location of the mutants are shown as (x) which represents high Shannon entropy score and indicated. These mutations are mainly located at a loop on the outer surface of the P2 domain.

狂犬病ウイルス弱毒株刺激樹状細胞移入による狂犬病防御免疫機構の解析

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 教授

研究要旨：狂犬病ウイルスで樹状細胞を *ex vivo* で刺激し、マウスに移入することで誘導される免疫反応、およびそれらの *in vivo* への移入による感染防御効果について検討した。マウス骨髄由来樹状細胞を弱毒狂犬病ウイルス ERA 株で刺激すると I 型 IFN、IL-12、ケモカインの産生が確認され、MHC class I、II の発現も増強した。次に刺激した樹状細胞をナイーブなマウスに移入することで中和抗体価、特異抗体価は上昇し、ウイルスに対する CTL 活性も亢進した。さらにそれらのマウスでは狂犬病ウイルスの致死性脳内接種に対し 75% の生存率を示した。一方、強毒ウイルス CVS 株で刺激した樹状細胞の自然免疫活性化は弱く、その後のウイルス感染に対する抵抗性は低かった。これらのことから弱毒ウイルスは樹状細胞を活性化し狂犬病ウイルスに対する特異的免疫を誘導するが、強毒ウイルスは樹状細胞を活性化することなく、その後免疫による排除を受けにくいことが推察された。

A. 研究目的

狂犬病ウイルスは致死性のウイルス性脳症を引き起こす。ウイルスは感染局所において、末梢神経や中枢神経系(CNS)に侵入する前に筋肉内で複製するとも報告されているが、その詳細は不明である。CNSへの侵入後は、ウイルスは特異的免疫応答を誘導することがないため生体内からの排除を受けない。一方、弱毒ウイルスは感染後、CNSにおいても強い免疫反応を誘導し、感染宿主は死を免れることができる。また動物においては生ウイルスによる経口免疫も行われており、弱毒ウイルスであるERA、SAD B19、SAG-1、SAG-2ウイルスが経口接種で狂犬病ウイルスに対する免疫を誘導することができる。経口免疫のメカニズムは十分には解明されていないが、免疫組織である扁桃でウイルスが感染し、複製することが示されている。扁桃などのリンパ組織はT細胞、B細胞に加え樹状細胞も豊富であり、樹状細胞が経口免疫の有効性に寄与している可能性が高い。

樹状細胞は自然免疫、獲得免疫応答に重要な役割を担っている抗原提示細胞である。未熟な樹状細胞は末梢組織や血中に存在しており、抗原を貪食後、プロセッシングを行い、脾臓や所属リンパ節へ移行し、そこでT細胞を活性化する。これまで樹状細胞を病原微生物で刺激し移入する樹状細胞ワクチンの効果としては、緑膿菌、結核菌、C型肝炎ウイルス、インフルエンザウイルス感染症などに対し有効性が報告されており、われわれも既にヘリコバクター・ピロリ感染に対する樹状細胞ワクチンの有用性を報告している。

通常ウイルス感染の初期において、I型IFNの誘導が抗ウイルス活性を示し、感染の拡大を防ぐが、狂犬病ウイルスのP蛋白はI型IFN産生を抑制する作用もあると報告されている。これらのことから生ワクチンに使用される弱毒ウイルスは樹状細胞を介して特異的な免疫を誘導することで、狂犬病ウイルスに対する免疫を誘導するが、強毒ウイルスでは樹状細胞を活性化する能

力が低い場合ウイルスを排除できない可能性が考えられた。

そこで今回の研究では弱毒ウイルスと強毒ウイルスで樹状細胞を *in vitro* で刺激し、その応答を観察するとともに、それら樹状細胞をマウスに移入することによる *in vivo* での免疫反応と狂犬病ウイルスによる抵抗性を評価した。その結果、弱毒ウイルスによる樹状細胞の活性化と、その樹状細胞の移入が狂犬病ウイルスに対する特異的免疫反応を引き起こすことでマウスに抵抗性を誘導することが確認され、弱毒生ワクチンによる感染防御の理論的根拠となることが考えられた。

B. 研究方法

1) ウイルス

弱毒狂犬病ウイルスとして ERA 株を、強毒狂犬病ウイルスとして CVS-11 株を使用した。ウイルスは神経芽細胞腫 C1300 細胞で増殖させた。ウイルス中和試験 (RFFIT) 用として、CVS-11 は BHK-21 細胞で増殖させた。

脳内接種用のウイルスとして CVS-11 感染乳飲みマウス 10% 脳乳剤を作成し、10 倍段階希釈の脳内接種により感染価を決定した。

2) 骨髄からの樹状細胞の樹立

マウス樹状細胞は Lutz らによるプロトコールに拠った。雌 5 週齢 C57BL/6 マウスは SPF 下で飼育した。まず、マウスの大腿骨から骨髄細胞を採取し、赤血球除去後、complete medium (RPMI 1640 培地に 10% ウシ胎児血清 (FBS)、0.5% ペニシリン、ストレプトマイシン、50 μ M 2-メルカプトエタノール、5 ng 遺伝子組み換え型マウス GM-CSF /ml を添加) で 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ で培養し、2 日目に非付着細胞を静かに取り除き、complete medium を加えた。5 日目に非付着細

胞を回収した。樹状細胞は MACS CD11c beads (Miltenyi Biotec, Bergish Gladbach, Germany) で positive selection により純化した。得られた樹状細胞 (BMDC) の純度は 90 % 以上であった。

3) 狂犬病ウイルスによる樹状細胞の刺激

BMDC (2.5×10^5 cells ml⁻¹) に ERA、CVS-11 ウイルスによる刺激を MOI 10 で行い 48 時間 37 $^{\circ}$ C にて培養した。48 時間後に上清は回収され、上清中の IFN- α 、IFN- β 測定は ELISA キットにて行い、Interleukin 12p40 (IL-12p40)、IL-12p70、MIP-1 β の RANTES 測定は Bio-plex Protein Array system (Bio-Rad) にて行った。また刺激された樹状細胞の表面抗原を flow cytometry にて解析を行った。刺激後の上清中の progeny virus の有無は C1300 細胞、BHK 細胞への感染の有無で確認した。刺激後の樹状細胞はマウスへの移入にも使用された。

4) Flow cytometry

表面抗原の発現は間接蛍光抗体法により FACSCalibur (BD Immunocytometry Systems, San Jose, CA) flow cytometer and CellQuest software にて測定した。同様に FACS 解析によりウイルス接種後の BMDC 細胞表面の MHC class I と II の発現を解析した。使用した抗体は一次抗体に FITC 標識 anti-mouse MHC class II (eBioscience, San Diego, CA) と anti-mouse MHC class I (BD Pharmingen, San Jose, CA)、FITC 標識 rat anti mouse monoclonal antibody を 2 次抗体として使用した。抗体の Fc 部分をブロックするために、anti-CD16/32 抗体 (eBioscience, San Diego, CA) を使用した。

5) 樹状細胞のマウスへの免疫

BMDC は ERA (MOI 10) あるいは CVS-11

(MOI 10)で48時間刺激、その後遠心分離にて上清を除去し、PBSで洗浄後、C57BL/6マウスに300 μ lを尾静脈より静注(3.0×10^5 cells/匹)し、さらに1週間後に再度同様に行った。無刺激の樹状細胞も同様に培養し、対照群のマウスに移入された。2回の免疫から1週間後に採血を行い、血清は中和抗体価(VNA)、特異ELISA抗体価の測定のために -20°C に保存された。それぞれのマウスから脾細胞を分離し、赤血球除去後、10%FCSを含むRPMI 1640培地で培養した。脾細胞 1.0×10^6 cells/mlを24穴プレートで培養し、3日後に上清中のIFN- γ 、IL-10測定をELISAにて行った。また脾細胞はcytotoxicity (CTL) assayのためにも使用された。同様に免疫したマウスは後述のウイルスの脳内接種に使用された。

6) VNAの測定

血清中の狂犬病ウイルスに対するVNAの測定はrapid fluorescent focus inhibiting test (RFFIT)にて行った。すべての血清sampleは 56°C 、30分で非働化し、2%FBS入り培地にて血清を2段階希釈した。その後200TCID₅₀のCVS-11を加え 37°C 5% CO₂にて90分反応させ、この後BHK-21細胞を加え、さらに24時間培養した。アセトン固定後、FITC標識抗狂犬病抗体(FujiRebio, TFB)で 37°C 30分染色し、蛍光顕微鏡にて評価された。VNAは国際標準との比較により求められた。十分なVNAは0.5 IU/ml以上と定義されている。

狂犬病のribonucleoprotein (RNP)に対する特異抗体価はELISAにて測定された。RNPは培養したCVS-11から常法に則り精製し、固相抗原として用いた。希釈したマウス血清を検体として、ウイルスRNP特異的IgG抗体価を定法に従って測定した。

7) CTL assay

脾細胞のCTL活性はCytoTox 96 Non-Radioactive Cytotoxicity Assay (Promega, Madison, WI)にて測定された。脾細胞を免疫後のマウス脾臓より採取し、effector細胞として使用した。Target細胞としてC57BL/6マウス由来のMC57G細胞に、ERAまたはCVS-11をMOI 10で45分感染させた。 1.0×10^4 個のTarget細胞にeffector細胞を様々なE/T比で加えた。反応後のLDHの遊離量を490nmで吸光度を測定し、細胞障害活性を算出した。

8) Challenge test

無刺激BMDc、ERA刺激BMDc (ERA-BMDc)、CVS-11刺激BMDc (CVS-BMDc)を移入されたマウスに対して、CVS-11脳乳剤を、2%FBSで希釈した200LD₅₀を含む30 μ lを頭蓋内に投与した。感染したマウスは2週間毎日観察、生死を記録し、脳内接種後14日目の時点で狂犬病感染のサインを示したのもも死亡とみなした。

9) 統計学的処理

すべてのデータはmean \pm standard deviationで示した。統計学的な比較はunpaired Student's t test、Wilcoxon-Mann-Whitney testで行われた。表面抗原の比較はWelch testにて行われた。生存率の評価はKaplan-Meier analysis (Statview; SAS Institute, Cary, N.C.)で行われた。

C. 研究結果

1) 狂犬病ウイルス刺激に対する樹状細胞の応答

骨髄樹状細胞(BMDc)をERAで48時間刺激すると、I型IFN、特にIFN- β 産生(443 ± 28 pg/ml)が確認され、無刺激の樹状細胞での

IFN- β 産生(0 pg/ml)と比較し、有意に高かった($p < 0.001$ (図 1))。またそれらサイトカインの産生は濃度依存的であった(data not shown)。一方、CVS-11 で樹状細胞を 48 時間刺激しても、IFN- α 、IFN- β 産生は無刺激群と比較し差を認めなかった。またウイルスが樹状細胞内で複製しているかを確認するため、上清中のウイルスを測定したが、上清中には progeny ウイルスは産生されていなかった(data not shown)。また、無刺激、CVS-11 刺激樹状細胞と比べ、ERA 刺激樹状細胞で IL-12p40 産生を確認できた($p < 0.05$)。ケモカインでは ERA 刺激の方が MIP-1 β 、RANTES をより多く産生していた($p < 0.05$ 、 $p < 0.001$ 、各々)。IL-12p70 産生は ERA 刺激で軽度認められた(12 pg/ml)。

表面抗原の評価では ERA で 48 時間樹状細胞を刺激することで、有意に MHC class I、II の発現が確認($p < 0.01$ 、 $p < 0.05$ 、各々)できたが、CVS-11 刺激では確認できなかった。(図 2)

これらのことから狂犬病ウイルス弱毒株 ERA では樹状細胞の成熟を引き起こすが、強毒株ウイルス CVS では引き起こさないことが確認できた。

2) 狂犬病ウイルス刺激樹状細胞によるマウス免疫後の応答

ERA 刺激では樹状細胞が成熟し、CVS-11 では引き起こされなかったため、次にそれらの樹状細胞をマウスに移入することにより、自然免疫応答が獲得免疫へ受け渡されるのかを検討した。ウイルスで 48 時間刺激した樹状細胞は 3.0×10^5 cells/匹で尾静脈より静注し、その 1 週間後にも同様に免疫し、さらにその 1 週間後に評価を行った。

まず、免疫後のマウスにおける脾細胞を採取し、サイトカイン産生、CTL 活性を検討した。その

結果、ERA-BMDC 移入マウス脾臓細胞のほうが無刺激 BMDC 移入マウス脾臓細胞より IFN- γ 産生、IL-10 産生が亢進していることが確認できた(図 3)。CVS-BMDC 移入マウス脾臓細胞では無刺激 BMDC 移入マウス脾臓細胞と差を認めなかった。CTL 活性は CytoTox にて評価された(図 4)。Target 細胞は C57BL/6 マウスと同系の遺伝的背景を持つ MC57G 細胞を使用した。E/T ratio を 20 以上とすると、CytoTox では background が高くなり、E/T ratio は 10 までが適当であった。MC57G に CVS-11 を感染させた細胞を target 細胞として使用した場合、ERA-BMDC 移入マウス脾臓細胞では強い CTL 活性を認めた(図 4(a))。その一方、CVS-BMDC 移入マウス脾臓細胞では CTL 活性を確認できなかった。MC57G に ERA ウイルスを感染させた細胞を target 細胞として使用した場合は、ERA -BMDC 移入マウス脾臓細胞では強い CTL 活性を認めたが、CVS-BMDC 移入マウス脾臓細胞では ERA-MC57G に対して CTL 活性を確認できなかった(図 4(b))。

免疫後のマウスの血清中の VNA、特異抗体価を検討した。VNA は RFFIT 法により評価された(図 5)。その結果、無刺激 BMDC 移入マウスでは狂犬病ウイルスに対する VNA は全く上昇していなかったが、ERA や CVS-11 で刺激した樹状細胞移入マウスでは VNA が著明に上昇しており、十分な抗体価である 0.5 IU/ml をすべてのマウスで超えていた。ERA-BMDC 移入マウスと比較すると、CVS-BMDC 移入の方が VNA は有意に上昇していた($p < 0.01$)。狂犬病ウイルスの RNP を固相抗原として、ELISA にて特異抗体価を検討した(図 6)。興味深いことに、VNA とは逆に、ERA-BMDC 移入マウスの方が、CVS-BMDC 移入マウスと比較し RNP に対する特異抗体価は有意に上昇していた($p < 0.01$)。無刺激樹状細胞移入マウスでは RNP に対する特

異抗体価は上昇していなかった。これらのことから ERA-BMDC 移入マウスでは Th1 免疫の CTL 活性、Th2 免疫である抗体価の獲得ができたが、CVS-BMDC 移入マウスでは Th2 免疫応答である抗体価の獲得のみが確認できた。

3) 免疫マウスに対する狂犬病ウイルス脳内接種による抵抗性獲得の検討

樹状細胞の末梢移入がマウスに対し狂犬病ウイルスに対する免疫を引き起こしたことが分かったため、次にそれらのマウスに狂犬病ウイルスを頭蓋内に 200LD₅₀ で投与し、生死を評価した(図 7)。その結果、無刺激 BMDC 移入マウスは CVS-11 脳内接種に対し 9 日目より死亡が確認され、10 日目には全例死亡した。一方、ERA-BMDC 移入マウスでは生存率は 73%であった。CVS-BMDC 移入マウスでは 10 日目まではすべてのマウスが生存していたが、徐々に死亡し、14 日目では生存率は 14%であり、ERA-BMDC 移入マウスの生存率より明らかに低かった。

D. 考察

狂犬病ウイルスの弱毒株では脳における免疫応答や抗ウイルス遺伝子(特に IFN 関係)の遺伝子発現が亢進し、その程度はより強毒株における変化より強かったという報告がある。狂犬病ウイルスの P 蛋白や G 蛋白がそれらの病原性に関与しているとも言われているが、その機序は十分には解明されていない。今回われわれは骨髄由来樹状細胞を弱毒株ウイルス ERA と強毒株ウイルス CVS-11 で刺激し、サイトカインやケモカインの産生を検討した。その結果、ERA で刺激した樹状細胞は I 型 IFN、IL-12p40 産生を認めた。一方、CVS-11 で刺激した樹状細胞では産生を確認できなかった。また最近の報告で

は狂犬病ウイルスは樹状細胞に感染し、弱毒狂犬病ウイルスの方が樹状細胞での IFN- α 発現が高いという報告もされた。われわれの検討では樹状細胞を狂犬病ウイルスで刺激した後の上清中には progeny ウイルスの産生は確認できなかった。この違いは使用した樹状細胞が、彼らはヒトの単球由来樹状細胞や単球であり、われわれはマウス骨髄由来樹状細胞であったこと、使用した狂犬病ウイルスも異なることが関係している可能性がある。狂犬病ウイルスのマクロファージ内での複製はウイルスの種類と使用した細胞によるとの報告もあり、マクロファージを CVS-11、HEP ウイルスで刺激した際、progeny virus の産生は認めなかったとされている。インフルエンザウイルスを樹状細胞に作用させた際、ウイルスは感染するが、上清中にはウイルスは確認できなかったという報告もある。またインフルエンザウイルスを樹状細胞(BMDC)に感染させると IL-12p40 産生は確認できたが IL-12p70 産生は認めなかったと報告されており、今回の ERA 刺激でも、IL-12p40 を産生していたが IL-12p70 産生は軽度であったことは同様の結果であった。以前の検討にて、狂犬病ウイルスでマクロファージを刺激するとケモカインである CXCL10(IP-10)や RANTES の産生を認めることを RT-PCR にて確認されている。今回のわれわれの検討でも MIP-1 β 、RANTES の産生が蛋白レベルで確認できた。RANTES は Th1 免疫の活性化に関係しており、ERA 刺激はより Th1 免疫を活性化すると示唆された。

また表面抗原では CVS-11 刺激と比較し、ERA 刺激で樹状細胞に MHC class I、II 発現が確認できた。CVS-11 の脳内接種では脳内に MHC class I の発現を認めるが class II 発現は弱く、弱毒性の RV194-2 (CVS-F3)ウイルスでは class II 発現も強かったと報告されている。これら

のことからも CVS-11 で刺激した樹状細胞は十分な抗原提示能を獲得できず、ERA で刺激した樹状細胞は抗原提示能を誘導できるため、特異的免疫を引き起こすことが可能であると示唆される。

HCV の NS3 pulsed BMDC(CpG 添加)や influenza virus で刺激した樹状細胞をマウスに移入することで、脾細胞の IFN- γ 産生が亢進し、CTL 活性も増強したとの報告がある。それらの結果と一致して、われわれの検討では ERA-BMDC 移入マウス脾臓細胞のほうが無刺激 BMDC 移入マウス脾臓細胞より IFN- γ 産生、IL-10 産生が亢進していることが確認できた。IFN- γ は Th1 型免疫応答の代表的なサイトカインであり、その一方、IL-10 は Th2 型免疫応答の代表的なサイトカインである。このことから、狂犬病 ERA で刺激した樹状細胞をマウスに移入することにより Th1、Th2 ともに活性化していることが示された。また CVS-BMDC 移入マウス脾臓細胞でも検討した結果、ERA-BMDC 移入マウス脾臓細胞とは異なり IFN- γ 、IL-10 産生は亢進していなかった。このことは CVS-BMDC における Th1、Th2 活性化は ERA-BMDC 移入マウス脾臓細胞と比較し弱いことを示唆する。CTL 活性の検討では、ERA-BMDC 移入マウス脾臓細胞で強い CTL 活性を確認できた。またその CTL 活性は CVS-MC57G に対しても認めたことから、ERA と CVS-11 と共通なエピトープに対する CTL 活性を認めたとも考えられる。CVS-BMDC 移入マウスでは ERA-MC57G に加え、CVS-11-MC57G に対しても CTL 活性を確認できず、Th1 免疫が活性化されていないことが確認できた。

CVS-11 で刺激した BMDC をマウスに移入したところ、VNA は著明に上昇し、むしろ ERA で刺激した BMDC を移入されたマウスより上昇していた。CVS-11 刺激にて樹状細胞は MHC class I

も II も発現せず、また CVS-11 で刺激した樹状細胞を移入されたマウスの脾臓細胞は IFN- γ も IL-10 も産生が低かった。IL-10 以外の Th2 サイトカインが VNA 産生に寄与した可能性もある。ERA で刺激した樹状細胞を移入されたマウスでも中和抗体は著明に増加しており、WHO の基準の 0.5 IU/ml をすべてのマウスで超えていた。ウイルスの RNP に対する特異抗体価は ERA-BMDC 移入マウスの方が CVS-BMDC 移入マウスと比較し高いことが判明した。VNA は CVS-BMDC の方が高く、VNA と RNP に対する特異抗体価は相関していなかった。中和抗体は G 蛋白に対するものであるとされており、CVS-BMDC 移入マウスでは RNP ではなく、G 蛋白に対する抗体を産生していたと考えられる。

狂犬病ウイルスで刺激した樹状細胞は progeny virus を産生していなかったため、遊離したウイルスが狂犬病ウイルス特異的な免疫を誘導したのではなく、ウイルスを抗原として取り込み、抗原提示した樹状細胞により引き起こされた特異的な免疫の誘導と考えられた。

ERA で刺激した樹状細胞を移入されたマウスでは狂犬病ウイルスの脳内接種に対し CVS-11 で刺激した樹状細胞移入マウスと比較し生存率が高かった。抗体が産生できないマウスでは狂犬病ウイルス接種後すべて死亡したと報告があり、そのことより抗体が狂犬病感染に対し必須であると考えられる。しかしながら脳内にウイルスを接種した際、VNA は脳内で確認できないとも言われていることや、血清抗体とは別の脳内抗体の存在を報告しているものもあることなど、その感染免疫には解明されていない点が多い。抗体以外の機序によるウイルス排除については BALB/c にワクチンを接種しその後ウイルスを脳内接種した場合の生存したマウスは中和抗体価が上昇していないものもいたという報告もある。

またワクチンに TNF- α や IL-1 α 、IFN- γ を腹腔投与しウイルスを脳内接種すると生存率が向上したが中和抗体価は上昇していないものもあったとの報告もあり細胞性免疫や中和抗体以外の特異的抗体の重要性を示唆されている。CTL の重要性としては、G 蛋白特異的な CTL をマウスに移入することによる防御効果も報告されている。脳内からのウイルス排除の時点では CTL 活性は認められたが、VNA の上昇はやや遅れていたとの報告もある。これらのことから感染に対するウイルス排除機構としては VNA に加え CTL が重要であること、VNA の上昇はウイルス排除には必須ではないことが示唆される。ERA で刺激した樹状細胞移入マウスではウイルスの RNP に対する抗体が CVS で刺激した樹状細胞移入マウスより上昇していたことから、G 蛋白に対する抗体だけでなく、狂犬病ウイルスの RNA や N、P 蛋白に対する抗体も重要である可能性が示唆された。これを支持するように、 β 2-ミクログロブリンノックアウトマウスに対する CVS-F3 の鼻腔内感染では、VNA は著明に上昇していたが、特異抗体が上昇してなく、感染に対しウイルス排除が遅れたとの報告もある。

E. 結論

弱毒狂犬病ウイルスは樹状細胞を活性化し、その樹状細胞の移入はマウスに狂犬病ウイルスに対する特異的免疫反応を Th1 免疫、Th2 免疫ともに引き起こし、ウイルス感染に対し感染防御効果を有することが確認できた。このことから狂犬病に対する生ワクチンは弱毒ウイルスを使用する方が効果的に免疫反応を誘導できることが確認された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yamagata, J., Ahmed, K., Khawplod, P., Mannen, K., Xuyen, DK., Loi, HH., Dung, NV., Nishizono, A.: Molecular epidemiology of rabies in Vietnam. *Microbiol. Immunol.* 51(9): 833-884, 2007
- 2) Arakawa, M., Yamashiro, T., Uechi, G., Tadano, M., Nishizono, A.: Construction of human Fab(γ 1/ κ) library and identification of human monoclonal Fab possessing neutralizing potency against Japanese encephalitis virus. *Microbiol. Immunol.* 51(6), 617-625, 2007
- 3) 西園 晃.: 人獣共通感染症 1. 狂犬病, 日本内科学会誌, 96(11), 2400-2405, 2007

2. 学会発表

- 1) 後藤和代、塩田星児、伊波英克、アハメド・カムルディン、西園晃: 骨髄系樹状細胞が狂犬病ウイルス感染症に及ぼす影響: 第 60 回日本細菌学会九州支部総会及び第 44 回日本ウイルス学会九州支部総会、長崎 (2007.10)
- 2) 後藤和代、塩田星児、伊波英克、アハメド・カムルディン、西園晃: 骨髄系樹状細胞が狂犬病ウイルス感染成立に及ぼす影響: 第 55 回日本ウイルス学会、札幌 (2007.10)
- 3) 後藤和代、塩田星児、伊波英克、西園晃: 骨髄系樹状細胞が狂犬病ウイルス感染成立に及ぼす影響: 第 37 回日本免疫学会、東京都 (2007.11)
- 4) 塩田星児、Khawplod, P., 後藤和代、伊波英克、Ahmed Kamruddin、三舟求真、西園晃: 日本製狂犬病ワクチンの皮内接種法の検討: 第 11 回日本ワクチン学会、横浜 (2007.12)

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

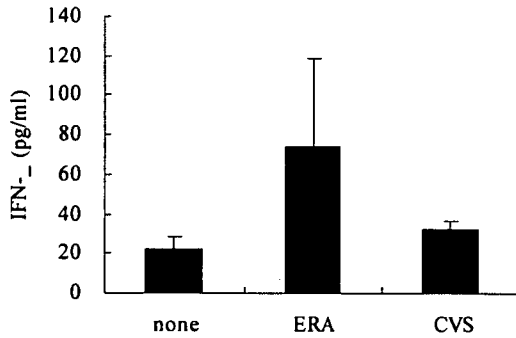
なし

3. その他

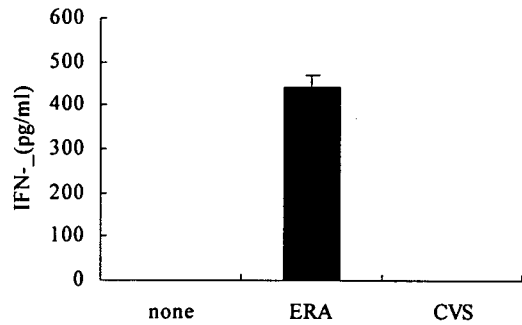
なし

図 1 狂犬病ウイルス刺激に対する樹状細胞からのサイトカイン、ケモカイン産生

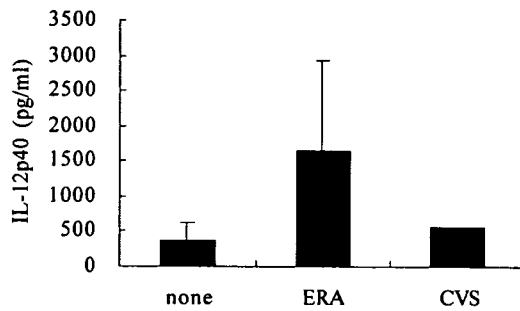
(a) IFN- α



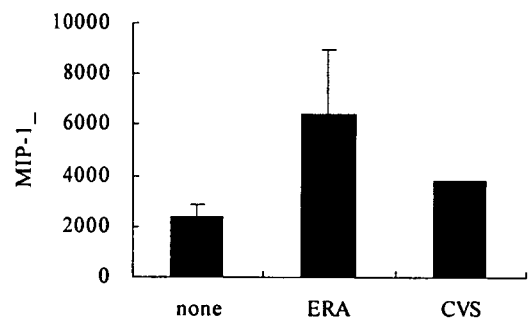
(b) IFN- β



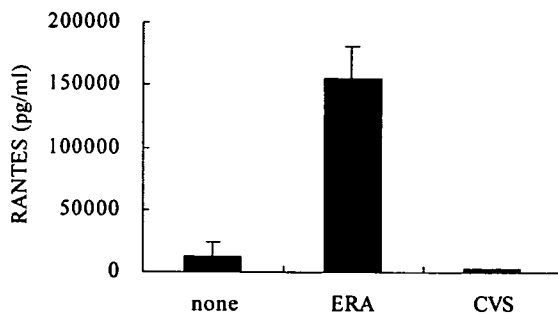
(c) IL-12p40



(d) MIP-1 β



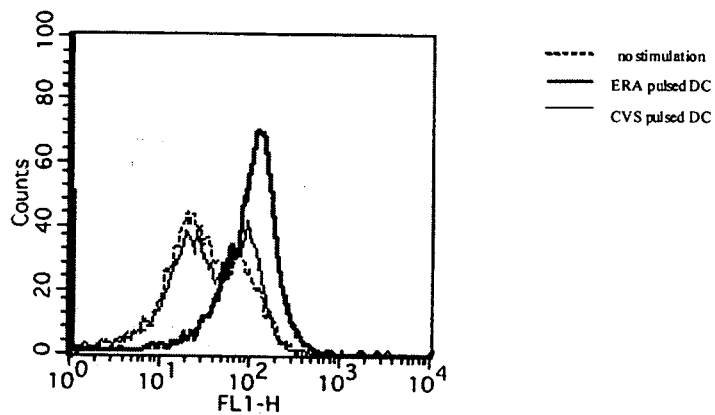
(e) RANTES



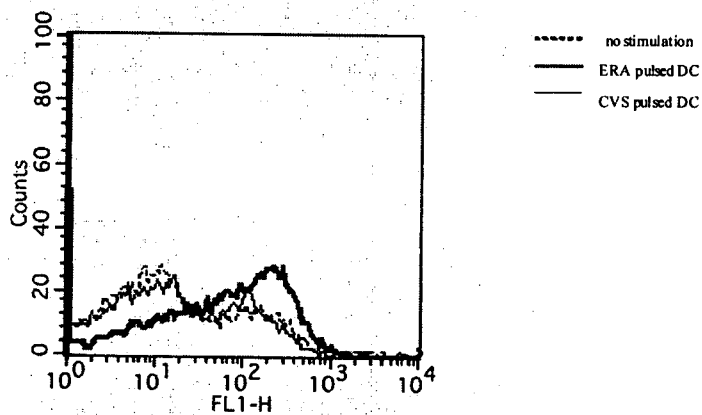
BMDC(2.5×10^5 /ml)に ERA、CVS-11 を MOI 10 で刺激を与え 48 時間後に上清回収しサイトカイン、ケモカイン産生を検討した。IFN- α (a)、IFN- β (b)産生は ELISA にて測定。各サンプルは triplicate にて測定した。IL-12p40(c)、MIP-1 β (c)、RANTES(d)は Bio-plex Protein Array system にて測定。各サンプルは duplicate にて測定した。

図2 ERA、CVS-11 刺激による BMDC 表面の MHC class I、II 発現

(a)



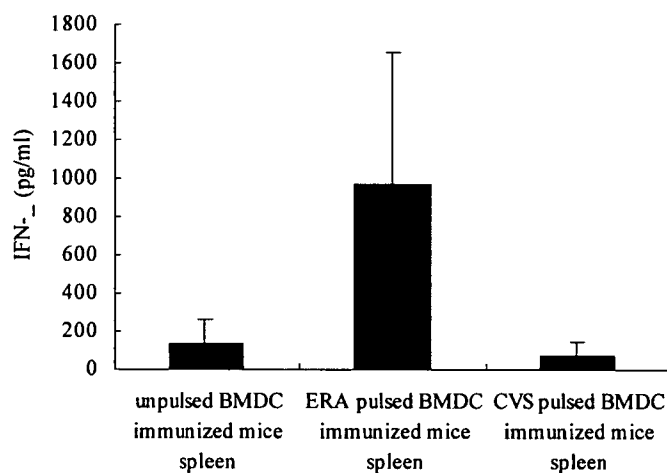
(b)



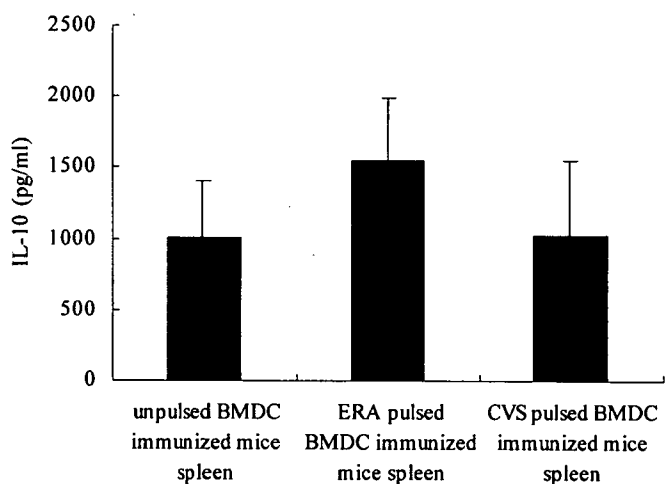
BMDC($2.5 \times 10^5/\text{ml}$)に ERA、CVS-11 を MOI 10 で刺激を与え 48 時間後に MHC class I (a)、MHC class II (b)発現を Flow cytometry にて検討した。

図 3 樹状細胞移入後のマウス脾細胞のサイトカイン産生能

(a)



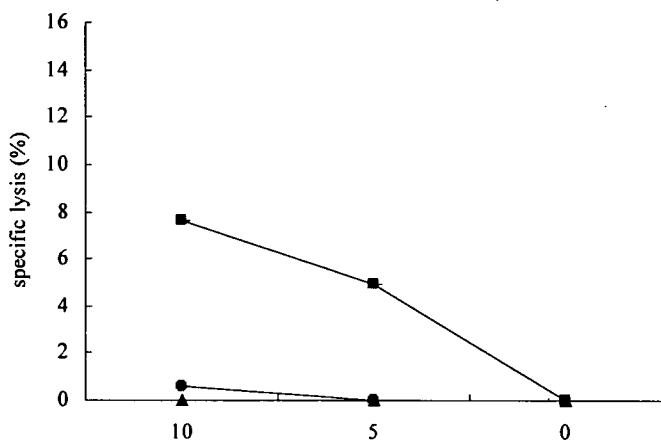
(b)



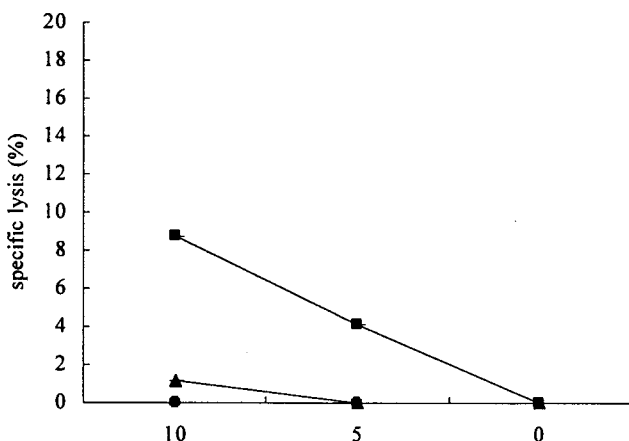
C57BL/6 マウス(6w 雌)に無刺激 BMDC、ERA(MOI 10)あるいは CVS-11(MOI 10)で刺激した BMDC を 3.0×10^5 cells/匹で尾静脈より静注。その 1 週間後にも同様に接種(3.0×10^5 /匹)し、さらにその 1 週間後に脾細胞を採取し 72 時間後の上清の IFN- γ (a)、IL-10(b)を ELISA にて測定。各サンプルは duplicate にて測定。

図 4 樹状細胞移入後のマウス脾細胞の CTL 活性

(a)

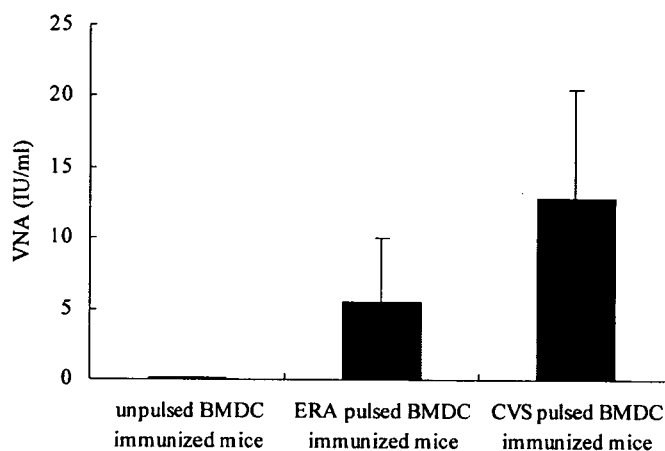


(b)



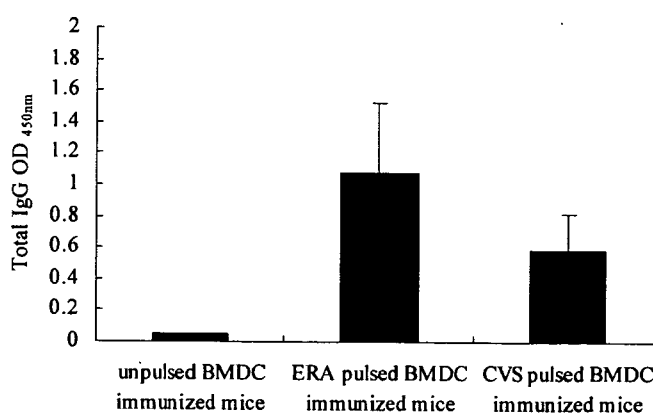
C57BL/6 マウス(6w 雌)に無刺激 BMDC、ERA(MOI 10)あるいは CVS-11(MOI 10)で刺激した BMDC を 3.0×10^5 cells/匹で尾静脈より静注。その 1 週間後にも同様に接種(3.0×10^5 匹)し、さらにその 1 週間後に脾細胞を採取し、CVS-11 (MOI 10)(a)あるいは ERA (MOI 10)(b)で刺激した MC57G に対する CTL assay を CytoTox にて測定。各サンプルは triplicate にて測定。■ : ERA-BMDC 免疫マウス脾細胞、● : CVS-BMDC 免疫マウス脾細胞、▲ : 無刺激 BMDC 免疫マウス脾細胞

図 5 樹状細胞移入後のマウスの血清中和抗体価



C57BL/6 マウス(6w 雌)に無刺激 BMDC、ERA(MOI 10)あるいは CVS-11(MOI 10)で刺激した BMDC を 3.0×10^5 cells/匹で尾静脈より静注。その 1 週間後にも同様に接種(3.0×10^5 /匹)し、さらにその 1 週間後に採血を行い、血清中和抗体価を RFFIT にて評価。各サンプルは duplicate にて測定。

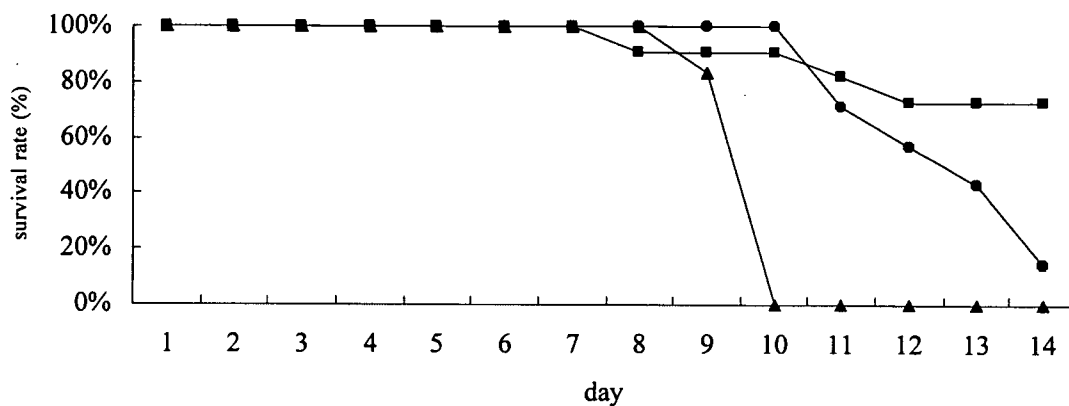
図 6 樹状細胞移入後のマウスの RNP に対する血清特異抗体価



C57BL/6 マウス(6w 雌)に無刺激 BMDC、ERA(MOI 10)あるいは CVS-11(MOI 10)で刺激した BMDC を 3.0×10^5 cells/匹で尾静脈より静注。その 1 週間後にも同様に接種(3.0×10^5 /匹)し、さらにその 1 週間後に採血を行い、RNP に対する特異抗体価を

ELISAにて評価。各サンプルは duplicate にて測定。

図 7 CVS-BMDC、ERA-BMDC 移入マウスに対する CVS-11 脳内接種後の生残率



C57BL/6 マウス(6w メス)に無刺激 BMDC、ERA(MOI 10)あるいは CVS-11(MOI 10)で刺激した BMDC を 3.0×10^5 cells/匹で尾静脈より静注。その 1 週間後にも同様に接種(3.0×10^5 /匹)し、さらにその 1 週間後にマウスに CVS-11 を 200 LD₅₀ で脳内接種。その後連日生死を確認。■ : ERA-BMDC 免疫マウス、● : CVS-BMDC 免疫マウス、▲ : 無刺激 BMDC 免疫マウス。同様の実験は 2 回行われた。

厚生労働科学研究費補助金(社会保障国際協力推進研究事業)

分担者研究報告書

.....

アジアにおける狂犬病等の動物由来感染症に関する
疫学およびサーベイランスに関わる調査研究の推進

分担研究者: 井上 智 国立感染症研究所獣医科学部 室長
協力研究者: Daraia L. Manalo フィリピン熱帯医学研究所(RITM)
協力研究者: Blanca R. Jarilla フィリピン熱帯医学研究所(RITM)
協力研究者: Plebian Medina フィリピン熱帯医学研究所(RITM)
協力研究者: Catalino Demetria フィリピン熱帯医学研究所(RITM)
協力研究者: Luz P. Acosta フィリピン熱帯医学研究所(RITM)
協力研究者: 野口 章 国立感染症研究所獣医科学部 主任研究官

研究要旨: 開発途上国では、狂犬病はヒトに重篤な健康危害を及ぼす人獣共通感染症としていまだに公衆衛生における大変重要な問題となっている。世界中で 55,000人が狂犬病で死亡しているが、そのほとんどがアジアとアフリカである。障害調整生命年数(DALY: Disability adjusted life year)によって推定される狂犬病の値は、トリパノソーマ症(Trypanosomiasis)の次、回線糸状虫症(Onchocerciasis)よりやや高い値、デングウイルス感染症(Dengue)より遙かに高い値を示している。狂犬病を容易に制御できていない大きな要因としては信頼の置ける疫学情報と正確な診断を行うための施設が整っていないことが上げられる。フィリピンでは、年間 100 万人あたり 6 人から 8 人が狂犬病で死亡しており、主たる感染源はイヌである。現在、フィリピンでは狂犬病の診断や疫学調査に必要な特異抗体の供給が十分でなく、発生した狂犬病の多くは臨床診断で行われている。このため、疫学等の科学的知見に基づいた効果的な狂犬病対策が行えない状況にある。本研究では、フィリピンで流行しているウイルス株に特異的な診断用モノクローナル抗体を作出して、これを利用した特異性の高い安価な抗原検出系の確立を行い、フィリピン国内における正確な診断システムの確立とモノクローナル抗体を利用した疫学サーベイランスを可能にすることを目的とした。今回、フィリピンで流行している狂犬病ウイルスを感染させたマウスを利用して3種類のモノクローナル抗体を確立することに成功した。それぞれのモノクローナル抗体は ELISA と RFFIT 法(中和抗体アッセイ法)における抗原検出用抗体として優れた反応性が示された。現在、この3クローンを利用した直接蛍光ラベルカクテル抗体を作出して、フィールドにおける野外狂犬病ウイルスに対する特異抗原の検出感度とその精度について有効性を評価している。