

越すことも可能であると言える。夏季の可動性の高い時期に吸血によってウイルスを取り込み、そのまま越冬すれば、ウイルスの越冬に大きく貢献するであろうと思われる。

本研究では、アカイエカ種群蚊の低温下での生存と脂肪酸合成系との関係を知ることができたが、今後は、脂質以外の生理活性物質の変動も併せて調べることが必要であると思われる。それらの結果によって、さらに詳細に越冬生理が解明されるであろう。また、アカイエカの冬季における適応性として、休眠の一つの形である栄養生殖分離が知られているが、その性質に関する情報を整理し、加味することによって、わが国におけるアカイエカ種群蚊の冬季、低温下における生理機能を明らかにすることができるとと思われる。

E. 結論

1) 春日部市用水路内で得た越冬アカイエカは脂肪に富み、シス型パルミトオレイン酸 (C16:1) が全体の 50% 近く含まれていた。

2) 感染研敷地内で 3 月～11 月に捕集されたアカイエカの脂質含量は、5 月上旬から下旬にかけて徐々に低下したが、9～10 月と再び増加し、その増減に伴いパルミトオレイン酸含量も変動した。

3) 室内実験において、種々の温度・日長条件下でのアカイエカおよびチカイエカの生存日数を比較したところ、すべての飼育条件においてアカイエカはチカイエカよりも長命であり、この寿命の違いは、アカイエカが低温 (10℃) 条件下で脂質含量を 2 倍以上増加させ、シス型パルミトオレイン酸を増加 (全体の 50% 以上) させ得ることに起因する

ことが示唆された。

4) チカイエカでは、羽化時のパルミトオレイン酸含量 20% はその後もほとんど変動せず、脂質含量の増加も見られなかった。

5) 凍結し難い脂肪酸であるパルミトオレイン酸を低温下でも合成できるアカイエカは、チカイエカとは異なり、冬季における生存を有利にし、越冬を可能にしていると推察された。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

1. 論文発表:

1) Kasai, S., Komagata, O., Tomita, T., Sawabe, K., Tsuda, Y., Kurahashi, H., Ishikawa, T., Motoki, M., Takahashi, T., Tanikawa, T., Yoshida, M., Shinjo, G., Hashimoto, T., Higa, Y. and Kobayashi, K. PCR-Based identification of *Culex pipiens* complex collected in Japan. *Jpn. J. Infect. Dis.* (in press).

2) Sawabe, K., Isawa, H., Hoshino, K., Sasaki, T., Roychoudhury, S., Higa, Y., Kasai, S., Tsuda, Y., Nishiumi, I., Hisai, N., Hamao, S. and Kobayashi, M. Host-feeding habits of potential bridge vectors of West Nile virus in Japan, especially focusing on the *Culex pipiens* species (Diptera: Culicidae), with the molecular identification based on ITS 1 sequence polymorphism. *J. Med. Entomol.* (in submitting).

2. 学会発表:

1) 澤邊京子, 森林敦子, 津田良夫, 葛西真治, 伊澤晴彦, 林利彦, 金京純, 小林陸生(2008) 日本産アカイエカ種群蚊の越冬に関する研究(1) 野外捕集蚊における脂質含量と脂肪酸組成の季節変動. 第60回日本衛生動物学会大会. 4月. 下野市.

2) 森林敦子, 澤邊京子, 津田良夫, 葛西真治, 小林陸生(2008) 日本産アカイエカ種群蚊の越冬に関する研究(2) アカイエカおよびチカイエカの寿命と脂質に関する室内実験. 第60回日本衛生動物学会大会. 4月. 下野市.

3) 小林陸生, 葛西真治, 伊澤晴彦, 林利彦, 二瓶直子, 津田良夫(2005) 都市部におけるアカイエカ越冬個体の観察. 第57回日本衛生動物学会大会. 6月. 札幌市.

H. 私的財産権の出願・登録状況

1. 特許情報:なし
2. 実用新案登録:なし
3. その他:なし

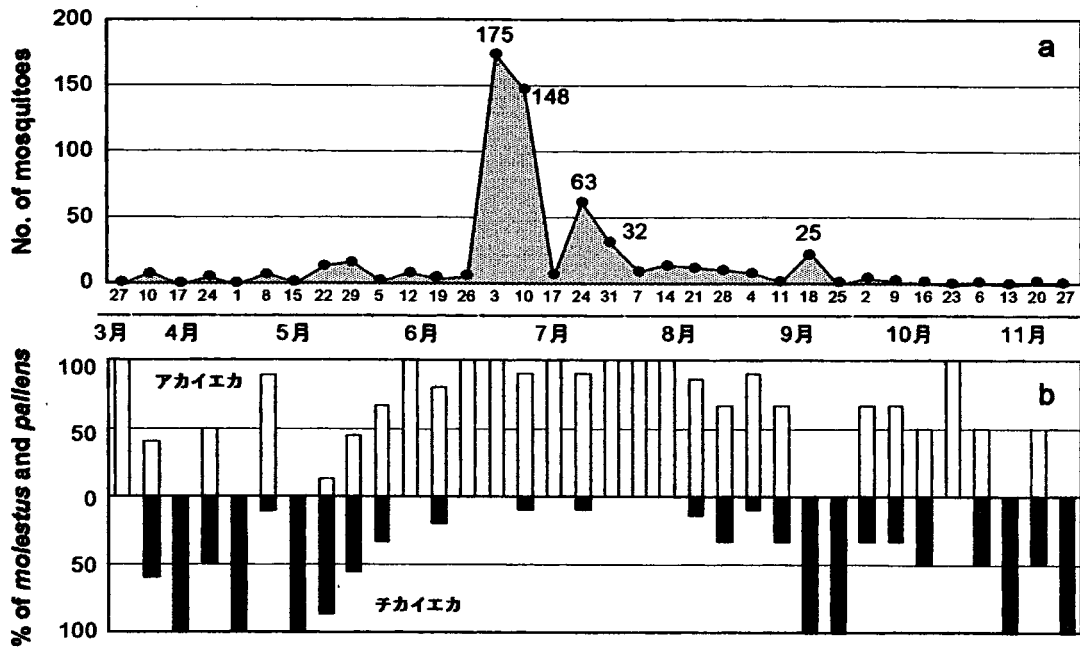


図1 2007年感染研トラップに捕集されたアカイエカ種群蚊の季節消長(a)および ACE2-assay、ITS1-assay により判別されたアカイエカとチカイエカの割合(b)

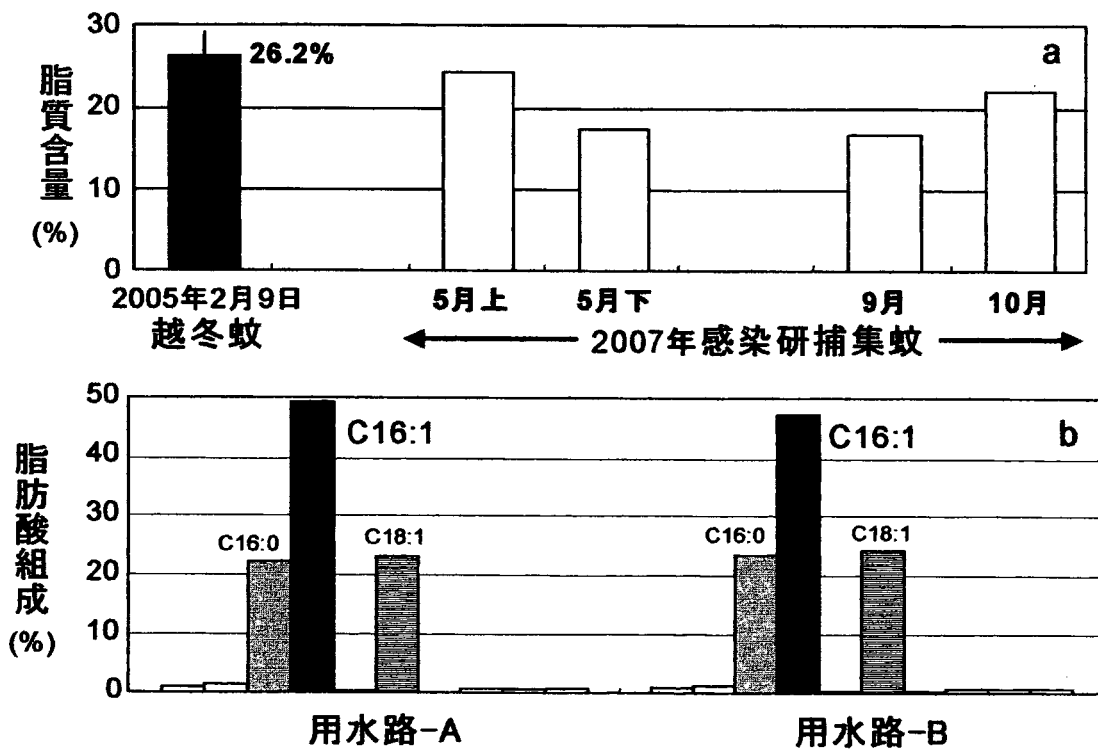


図2 アカイエカにおける脂質含量の季節変動(a)および用水路内越冬蚊の脂肪酸組成(b)

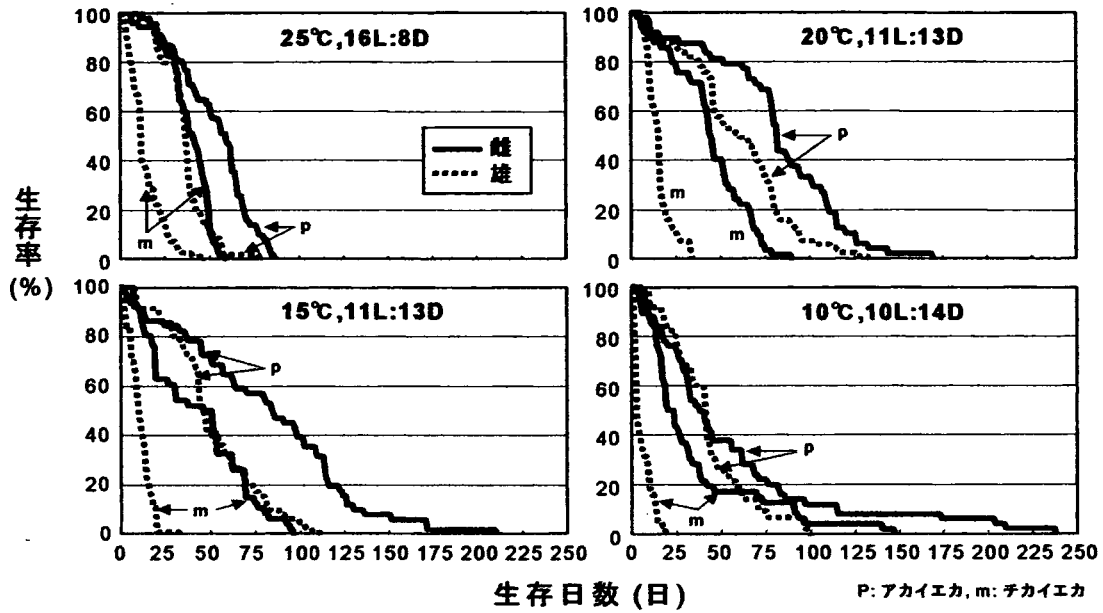


図3 アカイエカとチカイエカ成虫の生存率の比較

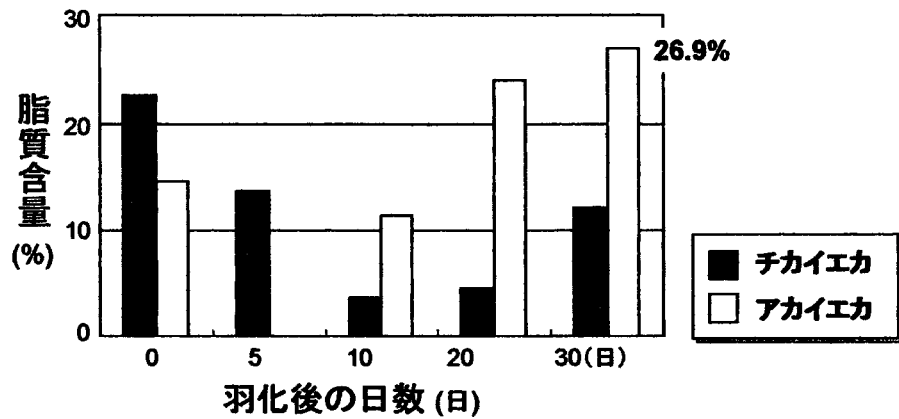


図4 低温・短日条件下での脂質含量の変化

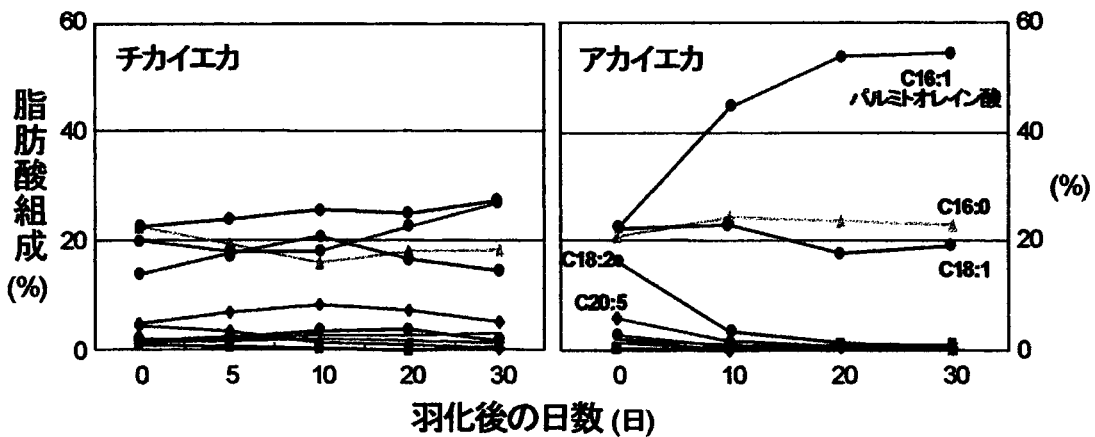


図5 低温・短日条件下での脂肪酸組成の変動

鳥類における WNV 検出法および抗 WNV 抗体検出法の確立に関する研究

分担研究者	山田 章雄	国立感染症研究所	獣医科学部	部長
協力研究者	今岡 浩一	国立感染症研究所	獣医科学部	第一室長
協力研究者	鈴木 道雄	国立感染症研究所	獣医科学部	第一室研究員
協力研究者	宇田 晶彦	国立感染症研究所	獣医科学部	第三室研究員
協力研究者	木村 昌伸	国立感染症研究所	獣医科学部	第一室研究員

研究要旨： マイクロアレイによる遺伝子検出法は、1 検体から同時に多数の標的遺伝子の検出ができる利点がある。そこでウエストナイルウイルス（WNV）の遺伝子診断系の確立の一環として、マイクロアレイ法を用いた WNV 特異的遺伝子の検出系について検討した。WNV 遺伝子検出の特異性および感度を検討するため、WNV をはじめとする各種のフラビウイルス属ウイルスならびに鳥類のウイルス性疾患の原因ウイルス遺伝子をプローブとしたカスタムマイクロアレイを作製した。WNV 4 株、JEV 3 株から RNA を抽出・精製して試験材料とし、カスタムマイクロアレイの反応特異性および検出感度を検討した。その結果、WNV 4 株のうちの 3 株、JEV 3 株は RNA 濃度 4 ng/μl でそれぞれ WNV、JEV 遺伝子プローブ群と特異的反応が見られ、他種のウイルス遺伝子プローブ群とは反応が認められなかった。0.4 ng/μl では検出限界以下となった。今回作製したカスタムマイクロアレイによって、WNV 遺伝子の特異的な検出が可能であったが、一部の WNV 株では特異的反応が認められなかった。今後、WNV の各ウイルス株に対応するよう検出特異性を改良するとともに、試験材料から抽出した RNA を適当な遺伝子増幅系で処理することにより検出感度の向上を図る必要がある。

A. 研究目的

マイクロアレイは 1 枚のスライドガラス上に数万から数十万の標的遺伝子の相補鎖をスポットすることが可能なプラットフォームである。マイクロアレイを病原体の遺伝子検出に用いることにより、1 検体から同時に多数の病原体特異的遺伝子の検査が可能となる。我々は今回、ウエストナイル

ウイルス（WNV）特異的遺伝子の検出・診断系にマイクロアレイ法を導入することを検討するため、WNV ならびに関連ウイルス遺伝子の塩基配列の一部をプローブとしてスポットしたカスタムマイクロアレイを作製し、その検出特異性および検出感度について検討した。

B. 研究方法

1. ウイルス RNA の抽出・精製： WNV4 株 (Lineage 1: NY99-6922, Eg101, g2266, Lineage 2: FCG)、日本脳炎ウイルス (JEV) 3 株 (Genotype 3: JaGAR01, Beijing, Genotype 1: kouchi) (Table 1) の培養上清から QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN) を用いて、添付のプロトコールに従い RNA を抽出、精製した。

2. ウイルス RNA の断片化処理の条件検討： ウイルス RNA の断片化処理は RNA Fragmentation Reagents (Ambion) を用いて行った。温度 30~80°C、処理時間 15~30 分の種々の条件で検討を行い、RNA 6000 Piko Kit (Agilent) を用いてアジレント 2100 バイオアナライザで分析した。

3. カスタムマイクロアレイを用いた WNV 遺伝子の検出特異性および検出感度の検討： Agilent Technologies 社の eArray、8-pack slide (8x15K) に、WNV をはじめとする各種のフラビウイルス属ウイルスならびに鳥類のウイルス性疾患の原因ウイルス遺伝子の塩基配列の一部 (60mer oligonucleotide) をプローブとしてスポットし、カスタムマイクロアレイを作製した (Table 2, 3)。SpikeIn コントロール用プローブとしてマウスの 18S rRNA センス鎖の塩基配列の一部を用いた。

カスタムマイクロアレイは始めに Version 1 (Table 2) を作製して実験結果を解析した上で、改良を加えた Version 2 (Table 3) を作製し、さらに検討を行った。Ver. 1 のアッセイには抽出・精製したウイルス RNA 溶液をそのままの濃度で用い (2.6~6.4 ng/ μ l)、Ver. 2 のアッセイには 4 ng/ μ l に調整したウイルス RNA 溶液を用いた。

ウイルス RNA を 70°C、15 分間 RNA

Fragmentation Reagents を用いて断片化処理した後、遠心沈渣を 20 μ l の TE バッファーに溶解して 65°C、5 分間熱処理し、2 分間氷冷した。ULYSIS Alexa Flour 546 Nucleic Acid Labeling Kit のラベリング溶液 5 μ l を加えて 80°C、15 分間熱処理を行った後、QIAamp RNeasy Mini Kit (QIAGEN) を用いて、同キットに添付のプロトコール通り処理して精製した。Ver. 2 のアッセイでは検出感度の検討のため、10 倍の段階希釈を行い、精製サンプルを 1~1000 倍希釈して使用した。サンプルに SpikeIn コントロールを添加し、さらにハイブリダイゼーションバッファーを加えてトータル 50 μ l としてガスケットスライド上に載せ、マイクロアレイスライドと貼り合わせた。ハイブリダイゼーションは 50°C、17~18hrs 行った。ハイブリダイゼーション後のマイクロアレイスライドは洗浄、乾燥させたのち、スキャナーで読み込み、スキャン画像を Feature Extraction (Agilent 社) を用いて解析し、データを数値化した。数値化したデータは解析ソフト (GeneArray Utility) を用いて最終的なアウトプットデータを得た。

C. 研究結果

カスタムマイクロアレイ Ver. 1 の試験結果を Fig. 1 に示す。WNV 4 株のうち、Lineage 1 に属する NY99 と Eg101 は NY99 遺伝子の塩基配列を基に作製したプローブ群のみと反応し、Lineage 2 に属する FCG 遺伝子プローブ群とは反応しなかった。その他の遺伝子プローブ群とは反応がみられなかった。Lineage 1 に属する g2266 はいずれのプローブ群とも反応しなかった。Lineage 2 に属する FCG は FCG 遺伝子プローブ群のみと反応し、NY99 遺伝子プローブおよびその他の遺伝子プローブ群とは反応がみられなかった。JEV 3 株はいずれの

WNV 遺伝子プローブ群とも反応せず、Genotype 3 の JaGAR と Beijing は Genotype 3 遺伝子プローブ群のみと強く反応し、Genotype 1 の kouchi は Genotype 1 遺伝子プローブ群のみに強く反応した。3 株ともその他の遺伝子プローブ群とは反応がみられなかった。

この結果を基に Ver. 2 を作製し、試験した結果を Fig. 2 に示す。WNV および JEV 各ウイルス株の特異的反応は Ver. 1 と同様で、それぞれのウイルス株に特異的な遺伝子プローブ群のみと反応した。g2266 は Lineage 1 特異的遺伝子プローブ群含むいずれの遺伝子プローブ群とも反応がみられなかった。検出感度については 4 ng/μl で特異的反応を検出できたが、10 倍に希釈した 0.4 ng/μl 以下の濃度では特異的反応は認められなかった。

D. 考察

今回作製したカスタムマイクロアレイは、WNV 遺伝子の特異的に検出することができ、遺伝子型の違いも区別することが可能であった。近縁のウイルス種との交差反応はみられなかった。一部の WNV 株では特異的反応がみられなかったことから、マイクロアレイに搭載する遺伝子プローブのバリエーションについて更なる検討が必要である。また検出感度の点からは、

特異的反応の検出には相当量の RNA 量を要することから、検体から抽出した RNA に対して何らかの遺伝子増幅系を使用することを検討する必要があると思われた。

E. 結論

マイクロアレイ法によって WNV 特異的遺伝子を近縁のウイルス種と区別して検出することが可能であることを示した。今後、WNV の各ウイルス株に対応するよう検出特異性を改良するとともに、試験材料から抽出した RNA を適当な遺伝子増幅系で処理することにより検出感度の向上を図る必要がある。また、本手法は多くの病原体およびその遺伝子型について 1 度に検査できる利点もある。

F. 健康危害情報

なし。

G. 研究発表等

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

Table 1) 実験に用いた WNV および JEV 株

WNV	lineage 1	NY99
		Eg101
	g2266	
	lineage 2	FCG
JEV	Genotype 3	JaGAr
		Beijing
	Genotype 1	kouchi

Table 2) カスタムマイクロアレイ ver.1 に搭載したウイルス遺伝子プローブ群

ID	分類	略称	プローブ数
NC_007580	St. Louis encephalitis virus, complete genome	SLEV	482
NC_002640	Dengue virus type 4, complete genome	DVT4C	485
AF311056	Deer tick virus strain ctb30 polyprotein gene, complete cds	DTVSC	226
NC_002617	Newcastle disease virus, complete genome	NDV	676
M12294	West Nile virus RNA, complete genome	WNV	447
AY842931	West Nile virus strain 385-99, complete genome	WNVS3	537
NC_003676	Apoi virus, genome	APOIV	436
NC_001477	Dengue virus type 1, complete genome	DVT1C	450
AF069076	Japanese encephalitis virus JaGAr 01 complete genome	JEV	465
NC_001475	Dengue virus type 3, complete genome	DENV-3	446
AF331718	Alkhurma virus strain 1176 polyprotein gene, complete cds	AVS1P	404
NC_009028	Ilheus virus, complete genome	ILHV	450
NC_001474	Dengue virus type 2, complete genome	DVT2C	477
AF161266	Murray Valley encephalitis virus strain MVE-1-51, complete genome	MVEV	490
DQ837642	Sepik virus strain MK7148, complete genome	SEPV	484
AY632542	Rocio virus strain SPH 34675 polyprotein gene, complete cds	ROCV	439
NC_005062	Omsk hemorrhagic fever virus, complete genome	OHFV	331
NC_003687	Powassan virus, complete genome	POWV	333
AB051292	Japanese encephalitis virus gene for viral protein, complete cds	JEV	483
NC_006551	Usutu virus, complete genome	USUV	442
AY898809	Alfuy virus strain MRM3929, complete genome	ALFV	462
NC_002031	Yellow fever virus, complete genome	YFV	487
NC_001672	Tick-borne encephalitis virus, complete genome	TBEV	238
NC_005039	Yokose virus, complete genome	YOKV	471
AY274504	Kunjin virus clone FLSDX polyprotein mRNA, complete cds	KUNV	116
NC_001809	Louping ill virus, complete genome	LIV	184
AF013399	Russian Spring-Summer encephalitis virus strain Sofjin NS5 protein (NS5) gene, partial c	RSEVS	10

Table 3) カスタムマイクロアレイ ver.2 に搭載したウイルス遺伝子プローブ群

ID	分類	略称	プローブ数
NC_002229	Gallid herpesvirus 2, complete genome	GaHV-2	426
NC_002577	Gallid herpesvirus 3, complete genome	GaHV-3	320
NC_007580	St. Louis encephalitis virus, complete genome	SLEV	380
NC_002617	Newcastle disease virus, complete genome	NDV	148
AY898809	Afuy virus strain MRM3929, complete genome	ALFV	403
NC_003687	Powassan virus, complete genome	POWV	337
NC_009028	Ilheus virus, complete genome	ILHV	392
AF160193	Apoi virus polyprotein gene, complete cds	APOIV	420
AY842931	West Nile virus strain 385-99, complete genome	WNVS3	286
AB051292	Japanese encephalitis virus gene for viral protein, complete cds	JEV	191
NC_001475	Dengue virus type 3, complete genome	DENV-3	390
AF069066	Tick-borne encephalitis virus strain Vasilchenko, complete genome	TBEV	290
NC_005039	Yokose virus, complete genome	YOKV	407
M12294	West Nile virus RNA, complete genome	WNV	422
AF069076	Japanese encephalitis virus JaGAR 01 complete genome	JEV	169
AF331718	Alkhurma virus strain 1176 polyprotein gene, complete cds	AVS1P	172
NC_001672	Tick-borne encephalitis virus, complete genome	TBEV	254
AY632542	Rocio virus strain SPH 34675 polyprotein gene, complete cds	ROCV	419
AY323490	Kyasanur forest disease virus polyprotein gene, complete cds	KFDV	86
NC_001477	Dengue virus type 1, complete genome	DVT1C	314
NC_004178	Infectious bursal disease virus segment A, complete sequence	IBDV	213
AF311056	Deer tick virus strain ctb30 polyprotein gene, complete cds	DTVSC	334
NC_002031	Yellow fever virus, complete genome	YFV	215
AY274504	Kunjin virus clone FLSDX polyprotein mRNA, complete cds	KUNV	97
NC_001451	Avian infectious bronchitis virus, complete genome	IBV	216
NC_002188	Fowlpox virus, complete genome	FWPV	407
NC_001474	Dengue virus type 2, complete genome	DVT2C	335
AY562986	Newcastle disease virus isolate anhinga/U.S.(F)/44083/93, complete genome	NDV	146
NC_006551	Usutu virus, complete genome	USUV	380
M38310	Tick-borne encephalitis virus structural protein gene, 5' end	TBEV	174
AF161266	Murray Valley encephalitis virus strain MVE-1-51, complete genome	MVEV	322
DQ324666	Gallid herpesvirus 1 isolate Bio-Trach UL47 and glycoprotein G genes, partial cds	GaHV-1	129
NC_001809	Louping ill virus, complete genome	LIV	129
AF326825	Dengue virus type 4 recombinant clone rDEN4, complete sequence	DVT4R	309
DQ485231	Newcastle disease virus isolate chicken/China/Guangxi11/2003, complete genome	NDV	192
DQ837642	Sepik virus strain MK7148, complete genome	SEPV	424
NC_005062	Omsk hemorrhagic fever virus, complete genome	OHFV	278

Figure 1) カスタムアレイ Ver. 1 の解析結果

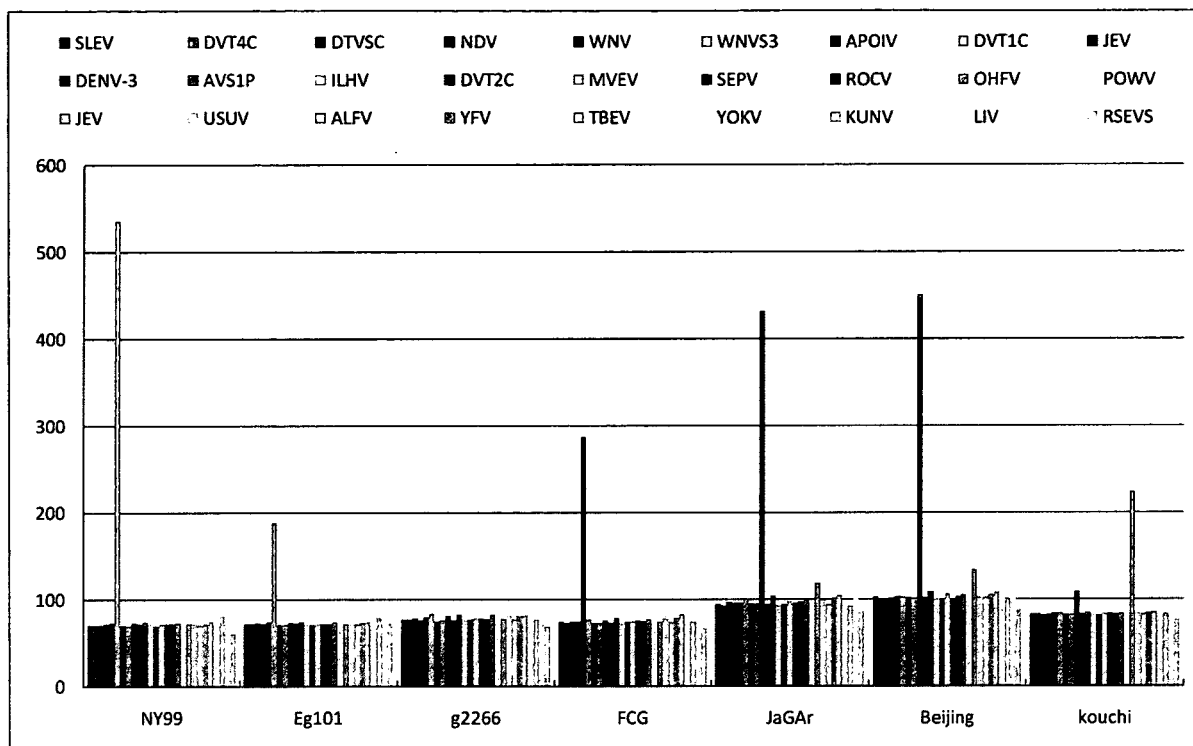
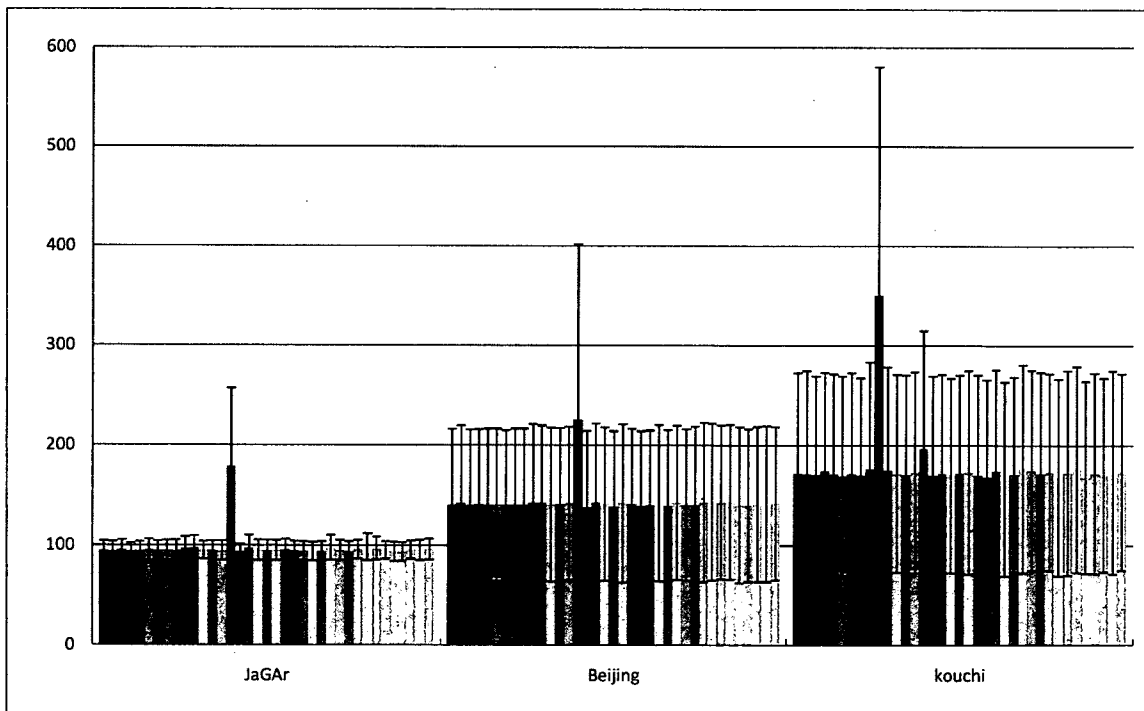
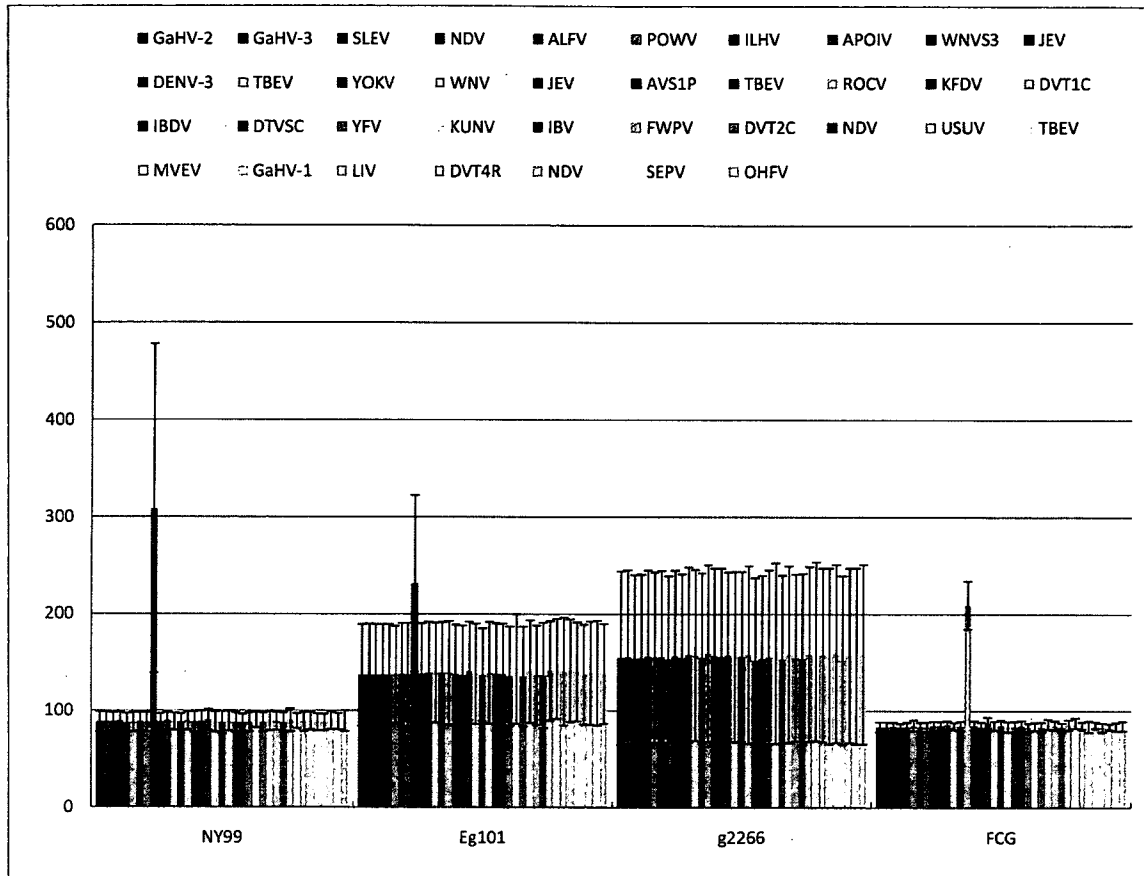


Figure 2) カスタムアレイ Ver. 2 の解析結果



厚生労働省・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侵入に備えての診断、予防対策への基盤的研究」班
(ウエストナイル熱ワクチンの開発)
(分担) 研究者 森田 公一 長崎大学・教授

研究要旨：

ウエストナイルウイルスは1998年まではアフリカ、中近東、西アジアで流行している蚊媒介性のウイルス感染症として知られていたが、1999年に有史以来初めて、アメリカ大陸に侵入し、2006年末までに米国を中心に数万人を越す患者が発生して国際感染症としてきわめて重要になっている。ウエストナイルウイルスは現在北米、中米、南米全域に拡大して今後、さらに多くの感染者、患者の発生が危惧されている。アメリカ大陸に伝播したウエストナイルウイルスは人やウマに感染した場合に従来知られていたより高い割合で中枢神経系に侵入し髄膜炎・脳炎をおこしている。わが国においてもアメリカからの発症者の輸入例が報告され始めたことから、このウエストナイルウイルス株が侵入し定着した場合にもヒトにおいて多くの脳炎患者が発生することが想定されるため、本研究ではヒト用不活化ワクチン並びに家畜用リコンビナント生ワクチン開発を目的としている。平成19年度はヒト用ホルマリン処理不活化ワクチンの最少有効投与量を検討し、中枢神経系への影響など追加のGLP試験を実施した。

(研究協力者)

長崎大学熱帯医学研究所

長谷部太

井上真吾

鍋島武 (ヒューマンサイエンス財団)

A.F. Khan

Maria del Carmen Parquet

(財) 阪大微生物病研究所 (観音寺研究所)

福家 功

木村優子

真鍋貞夫

谷下修

石川豊数

石橋正英

A. 研究目的

わが国へのウエストナイルウイルスの侵入にそなえ、感染予防に有効なワクチン開発を目的として、組織培養法を用いたヒト用不活化ウエストナイルワクチンおよび、日本脳炎ウイルス生ワクチン株の遺伝子にウエストナイルウイルスウイルス粒子表面蛋白質遺伝子を挿入したリコンビナント生ウエストナイルワクチン開発を目的としている。

B. 研究方法

[1] ヒト用ウイルス不活化ワクチンの最少有効投与量ならびに IgG 抗体価の検討

(1) ワクチン感染防御実験-1

ホルマリン不活化ワクチン (106.4 μ g/mL) を 13.3 μ g から 809pg まで 4 倍階段希釈し、0.5mL をマウス (4 週齢、オス、C57BL/6N) 60 匹に 1 週間間隔で 2 回腹腔内投与した。2 回目のワクチン投与から 2 週間後に致死量 (500MLD₅₀) の WNV(NY99 株) を攻撃し、生残数を記録した。

(2) ワクチン感染防御実験-2

ホルマリン不活化ワクチン (106.4 μ g/mL) を 52ng から 12.6pg まで 4 倍階段希釈し、0.5mL をマウス (7 週齢、オス、C57BL/6N) 57 匹に 1 週間間隔で 2 回腹腔内投与した。2 回目のワクチン投与から 2 週間後に致死量 (500MLD₅₀) の WNV(NY99 株) を攻撃し、生残数を記録した。

(3) 抗フラビウイルス IgG 抗体価を IgG 間接 ELISA

ホルマリン不活化ワクチンを投与したマウスから第 1 回ワクチン接種 1 週後、第 2 回ワクチン接種 2 週後、攻撃ウイルス接種 1 ヶ月後に採血を実施し、日本脳炎ウイルスを抗原として抗フラビウイルス IgG 抗体価を IgG 間接 ELISA にて測定した。

[2] 動物の安全性薬理試験

追加の GLP 試験を下記の項目について実施した。

a) ラットにおける中枢神経系への影響

ラット 12 匹にワクチン (ワクチン接種群) あるいは生理食塩水 (対照群) を 0.5mL/kg を 1 回皮下接種し、被検物質の投与前、投与後 1 時間、2 時間、4 時間、8 時間、および 24 時間に観察してスコアをつけた (Irwin 法)。観察項目は意識、情緒、運動器、中枢神経系興奮、協調運動の異常、筋肉の状態、反射、眼球、唾液の分泌、全身の状態 (体温、肌の色、呼吸、下痢等) である。

b) イヌにおける心血管系への影響

イヌ 8 匹にワクチン (ワクチン接種群) あるいは生理食塩水 (対照群) を 0.5mL/kg を 1 回皮下接種し、被検物質の投与前、投与後 1 時間、2 時間、4 時間、8 時間、および 24 時間に観察した (テレメトリー法)。観察項目は血圧、心電図、心拍数である。

c) イヌにおける呼吸器系への影響

イヌ 8 匹にワクチン (ワクチン接種群) あるいは生理食塩水 (対照群) を 0.5mL/kg を 1 回皮下接種し、被検物質の投与前、投与後 1 時間、2 時間、4 時間、8 時間、および 24 時間に観察した (テレメトリー法)。観察項目は呼吸数、胸郭運動、採血して血液ガス (pO₂, pCO₂, pH、ヘモグロビン O₂) の測定である。

d) イヌにおける一般状態への影響

c) のイヌにおける呼吸器系への影響について検査したイヌ 8 匹について、被検物質の投与前、投与後 1 時間、2 時間、4 時間、8 時間、および 24 時間に一般状態を観察した (テレメトリー法)。

C. 結果

[1] ヒト用ウイルス不活化ワクチンの最少有効投与量ならびに IgG 抗体価の検討

(1) ワクチン感染防御実験-1

ホルマリン不活化ワクチン (106.4 μ g/mL) を 13.3 μ g から 809pg まで 4 倍階段希釈し、2 回腹腔内投与した場合には 13.3 μ g から 3.2ng まで 100% 感染防御した。809pg で

86%感染防御した。

(2) ワクチン感染防御実験-2

ホルマリン不活化ワクチン (106.4 μg/mL) を 52ng から 12.6pg まで4倍階段希釈し、2 回腹腔内投与した場合には 52ng から 3.2ng まで 100%感染防御した。809pg 以降 71%、14%、29%、13%と生残率が低下していった。結果を(表-1)に示す。

Results of WNV Vaccine Efficacy Test

Vaccine dilution	Vaccine amount	第1回		第2回		合計	
		Survivor/ Tested	Survival Rate (%)	Survivor/ Tested	Survival Rate (%)	Survivor/ Tested	Survival Rate (%)
4 ¹ x dil.	13.3μg	6/6	100	—	—	6/6	100
4 ² x dil.	3.3μg	7/7	100	—	—	7/7	100
4 ³ x dil.	830ng	7/7	100	—	—	7/7	100
4 ⁴ x dil.	207ng	7/7	100	—	—	7/7	100
4 ⁵ x dil.	52ng	7/7	100	7/7	100	14/14	100
4 ⁶ x dil.	13ng	7/7	100	7/7	100	14/14	100
4 ⁷ x dil.	3.2ng	7/7	100	7/7	100	14/14	100
4 ⁸ x dil.	809pg	6/7	86	5/7	71	11/14	79
4 ⁹ x dil.	202pg	—	—	1/7	14	1/7	14
4 ¹⁰ x dil.	50.5pg	—	—	2/7	29	2/7	29
4 ¹¹ x dil.	12.6pg	—	—	1/8	13	1/8	13
Negative Control	0pg	0/5	0	1/7	14	1/12	8

C57BL/6N mice (6week, 7 week old) were used. Vaccination was done twice, i.p. (0.7mL/head). Challenge Virus was WNV (Strain: NY99) 500ELD50 (~3.24 x 10⁷PFU/mL).

(表-1) ワクチン感染防御実験-1 および-2

(3) 抗フラビウイルス IgG 間接 ELISA

上記のワクチン感染防御実験-1 に用いたマウスの血清について抗フラビウイルス IgG 間接 ELISA を実施したところ、第2回ワクチン接種2週後における IgG 抗体価は投与ワクチン量に比例し、1:1167 以上の IgG 抗体価を有すれば 100%感染防御することが判明した。結果を(表-2)に示す。

Anti-Flavivirus IgG titer of WNV vaccinated mice

Vaccine dilution	4 ¹ x dil.	4 ² x dil.	4 ³ x dil.	4 ⁴ x dil.	4 ⁵ x dil.	4 ⁶ x dil.	4 ⁷ x dil.	4 ⁸ x dil.	Negative Control
Vaccine amount	13.3μg	3.3μg	830ng	207ng	52ng	13ng	3.2ng	809pg	0pg
第1回採血	<500	<500	<500	<500	<500	<500	<500	<500	<500
第2回採血	6333	4333	3400	3433	1900	1167	<500	<500	<500
Survival Rate (%)	100	100	100	100	100	100	100	86	0

(表-2) 抗フラビウイルス IgG 抗体測定 (IgG 間接 ELISA)

[2] 動物の安全性薬理試験

a) ラットにおける中枢神経系への影響

ワクチン投与群で対照群と比較して有意な変化は認められなかった。(表3)

Test substance	Dose (ml/kg, s.c.)	Signs	Before	Time after administration (hour)				
				1	2	4	8	24
生理食塩水	0.5	No vaccine-related findings	66 ^a	66	66	66	66	66
不活化ワクチン	0.5	No vaccine-related findings	66	66	66	66	66	66

a: Physiological signs

b: Number of animals showing the sign / Number of animals tested

(表-3) ラットにおける中枢神経系への影響

b) イヌにおける心血管系への影響

ワクチン投与群において 4 例中 3 例で平均血圧が投与後 8 時間で 145mmHg となり、対照群と比較して 21mmHg (17%) の増加が認められた(表-4)。有意な差ではなかったが血圧を上昇させる傾向を示した。また、心拍数、心電図についてもいずれの時点においても有意な影響を示さなかった。

Table Effects of Vaccine on mean blood pressure in conscious dogs

Test substance	Dose (ml/kg, s.c.)	Number of animals	Before	Mean blood pressure (mmHg)				
				Time after administration (hour)				
				1	2	4	8	24
Normal Saline	0.5	4	125±16	126±25	127±15	129±17	124±16	110±14
WNV vaccine	0.5	4	115±13	124±19	125±15	138±22	145±22	110±14

(表-4) イヌにおける平均血圧への影響

c) イヌにおける呼吸器系への影響

ワクチン投与群において呼吸数、動脈血中の pO₂, pCO₂, pH、ヘモグロビン O₂ 飽和についていずれの時点においても有意な影響を示さなかった。

d) イヌにおける一般状態への影響

ワクチン投与群においていずれの時点においても一般行動に異常を示さなかった。

D. 考察

- (1) 試作したヒト用のウエストナイルウイルス不活化ワクチンのワクチン感染防御実験-1、-2により以下の結論が得られた。即ち、ウエストナイルワクチン試作品を2回腹腔内投与したマウスでの場合、致死量の攻撃ウイルス接種(腹腔内投与)に対してワクチン中のウイルス抗原量 3.2ng/shot で100%感染防御しうることが判った。
- (2) さらに攻撃ウイルス接種(腹腔内投与)直前のマウス抗フラビウイルス IgG 抗体価が 1 : 1167 以上であれば 100%感染防御しうることが判った。
- (3) 予定臨床投与量の約 10 倍量に相当する 0.5mL/kg を単回投与したラット、イヌでの場合においてラットの中枢神経系への影響やイヌでの心血管系、呼吸器系および一般状態において、ワクチン投与による影響は認められなかったことから、西ナイル熱ワクチンの臨床投与量の 10 倍量でも明らかな全身性の毒性はないものと判断された。

E. 結論

不活化ワクチンについては追加 GLP 試験が終了したので、今後ヒト臨床試験用ロットを作製し、平成 20 年度中にヒトでの臨床試験を実施する必要がある。

G. 研究発表

1) 論文発表

Yu, F., Hasebe, F., Inoue, S., Mathenge, E. G., Morita, K., Identification and characterization of RNA-dependent RNA polymerase activity in recombinant Japanese encephalitis virus NS5 protein. Arch Virol. Vol.152 (10): 1859-1869, 2007.

Dimaano, E. M., Saito, M., Honda, S., Miranda, E. A., Alonzo, M.T.G., Valerio, M.D., Mapua, C.A., Inoue, S., Kumatori, A., matias, R., Natividad, F.F., Oishi, K. Lack of efficiency of high-dose intravenous immunoglobulin treatment of severe thrombocytopenia in patients with secondary dengue virus infection. Am. J. Trop. Med. Hyg. Vol. 77 (6), 1135-1138, 2007.

Pandey, B.D., Morita, K., Khanal, S.R., Takasaki, T., Miyazaki, I., Ogawa, T., Inoue, S., Kurane, I., Dengue Virus, Nepal. Emerging Infectious Diseases. Vol.14 (3), 514-515, 2007.

Natividad, F.F., Daroy, M.L.G., Alonzo, M.T., Matias, R.R., Suarez, L.A.C., Inoue, S., Use of IgM-capture ELISA for confirmation of Japanese encephalitis infections in the Philippines. Southeast Asian J Trop Med Public Health, Vol.37 (suppl 3), 136-139, 2006.

Oishi, K., Mapua, C.A., Carlos, C.C., Cinco-Abanes, M.T.D.D., Saito, M., Inoue, S., Morita, K., Natividad, F.F., Dengue and other febrile illness among children in the Philippines. Dengue Bulletin Vol.30, 26-34, 2006.

Carlos, C.C., Oishi, K., Cinco, M.T.D.D., Mapua, C.A., Inoue, S., Cruz, D.J.M., Pancho, M.A.M., Tanig, C.Z., Matias, R.R., Morita, K., Natividad, F.F., Igarashi, A., Nagatake, T., Comparison of clinical features and hematologic abnormalities between dengue fever and dengue hemorrhagic fever among children in the

Philippines. Am. J. Trop. Med. Hyg. Vol. 73 (2), 435-440, 2006.

Kitabatake, M., Inoue, S., Yasui, F., Yokochi, S., Arai, M., Morita, K., Shida, H., Kidokoro, M., Murai, F., Le, M.Q., Mizuno, K., Matsushima, K., Kohara, M., SARS-Co V spike protein-expressing recombinant vaccinia virus efficiently induces neutralizing antibodies in rabbits pre-immunized with vaccinia virus. Vaccine, Vol.25, 630-637, 2007.

Inoue, S., Fuke, I., Khan, A.H., Herrera, G.P., Parquet, M.C., Hasebe, F., Ishikawa, T., Morita, K., Development of inactivated vaccine against West Nile virus infection. (manuscript for publication is under preparation)

2) 学会発表

国際会議における発表

Inoue, S., Khan, A.H., Fuke, I., Ishikawa, T., Herrera, G.P., Hasebe, F., Morita, K., Development of inactivated vaccine against West Nile virus infection. 19th Philippine Association for Laboratory animal Science (PALAS) Annual Scientific Conference. (Mandaluyong City, Metro Manila, Philippines, May 18, 2007).

Nga, P.T., Thuy, N.T., Yen, N.T., Dat, D.T., Inoue, S., Parquet, M.C., Morita, K., Emerging possible sub-type of Nam Dinh virus associated with acute encephalitis syndrome in Vietnam. Asian Research Forum on Emerging and Reemerging Infections-2007. (Nagasaki city, Japan, January 15-16, 2007).

Lan, N.T.P., Kikuchi, M., Huong, V.T., Ngu, V.T., Dao, H.N., Tham, V.D., Dat, T.V., Ha, D.Q., Oyama, T., Morita, K., Yasunami, M., Hirayama, K., Susceptible and protective HLA alleles against dengue hemorrhagic fever in Vietnam. Asian Research Forum on Emerging and Reemerging Infections-2007. (Nagasaki city, Japan, January 15-16, 2007).

Hirayama, K., Lan, N.T.P., Kikuchi, M., Huong, V.T., Ngu, V.T., Dao, H.N., Tham, V.D., Dat, T.V., Ha, D.Q., Oyama, T., Yasunami, M., Morita, K., Genetic Predisposition to dengue hemorrhagic fever/dengue shock syndrome (DHF/DSS) Asian Research Forum on Emerging and Reemerging Infections-2007. (Nagasaki city, Japan, January 15-16, 2007).

国内会議における発表

井上真吾、福家 功、石川豊教、Posadas Guillermo、Parquet Maria del Carmen、長谷部 太、森田公一：西ナイルウイルス不活化ワクチンの開発と有効投与量の評価。第48回日本熱帯医学会大会・大分県別府市、2007年10月12—13日

余 福勲、長谷部 太、井上真吾、Edward Mathenge、木下一美、森田公一：Mosquito La protein binds to the 3' untranslated region of the positive and negative strand Japanese encephalitis virus RNAs and inhibits RNA replication in vitro。第48回日本熱帯医学会大会・大分県別府市、2007年10月12—13日

斎藤麻里子、本田章子、井上真吾、有吉紅也、大石和徳：デングウイルス二次感染症におけるマクロファージによる血小板貪食クリアラン

スの亢進. 第 48 回日本熱帯医学会大会・大分県別府市、2007 年 10 月 12—13 日

木下一美、Baclig Michael O., Gervacio Leonora T. S., Matias Ronald. R., Natividad, Filipinas F., Nguyen Thanh Hung, Vu Thi Que Huong, 井上真吾、森田公一、長谷部 太: フローサイトメトリーを用いたデング患者血液の解析. 第 48 回日本熱帯医学会大会・大分県別府市、2007 年 10 月 12—13 日

Posadas Guillermo、鍋島 武、Parquet Maria del Carmen, Suu Pham Ti, Thuy Nguyen Thanh, Nga Phan Thi, 井上真吾、長谷部 太、森田公一: ベトナム北部の蚊からの Banna ウイルス近縁ウイルスの分離. 第 48 回日本熱帯医学会大会・大分県別府市、2007 年 10 月 12—13 日

久保 亨、森田公一、Paweska Janusz、Le Roux channel: Rift Valley Fever ウイルスに対する LAMP 法の確立. 第 48 回日本熱帯医学会大会・大分県別府市、2007 年 10 月 12—13 日

安井文彦、甲斐知恵子、北島正大、井上真吾、米田美佐子、森田公一、松島綱治、小原道法: SARS-CoV ヌクレオキャプシドタンパク質の免疫による SARS-CoV 感染後の肺炎重篤化への関与. 第 55 回日本ウイルス学会学術集会・北海道札幌市、2007 年 10 月 21 日-23 日

Parquet Maria del Carmen、余 福勲、鍋島 武、Pasadas Guillermo、長谷部 太、森田公一: New virus isolated from mosquitoes in Vietnam. 第 55 回日本ウイルス学会学術集会・北海道札幌市、2007 年 10 月 21 日-23 日

加藤大介、左 一八、長谷部 太、森田公一、鈴木康夫、鈴木 隆: フラビウイルス結合性糖鎖分子の構造と機能. 第 55 回日本ウイルス学会学術集会・北海道札幌市、2007 年 10 月 21

日-23 日

余 福勲、長谷部 太、井上真吾、木下一美、森田公一: Mosquito La protein binds to the 3' end of the positive and negative strand JEV RNAs and inhibits RNA replication in vitro. 第 55 回日本ウイルス学会学術集会・北海道札幌市、2007 年 10 月 21 日-23 日

久保 亨、森田公一: Rift Valley Fever ウイルスに対する LAMP 法の確立. 第 55 回日本ウイルス学会学術集会・北海道札幌市、2007 年 10 月 21 日-23 日

鍋島 武、Parquet Maria del Carmen、余福勲、Posadas Guillermo、井上真吾、長谷部 太、森田公一: ベトナム北部の蚊からの Banna ウイルス近縁ウイルスの分離. 第 55 回日本ウイルス学会学術集会・北海道札幌市、2007 年 10 月 21 日-23 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
	大滝尚広	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。平成 17 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、平成 18 年度は粒子形態と中和エピトープについて調べた。今年度は、VLP 抗原産生細胞株の樹立を試みた。

CHO-K1 細胞への WNV prM-E cDNA 導入後、薬剤選択と限界希釈により VLP を恒常的かつ高効率に産生するクローンを選択した。また、樹立 CHO 細胞クローンを無血清培地ないしタンパク質不含培地に馴化させ、生物学的な汚染の起こらない VLP 産生を可能にした。CHO 細胞クローン由来 VLP は成熟した E、M 抗原から構成され、WNV 中和抗体への反応性を有した。VLP は平衡シヨ糖密度勾配遠心法で比重=1.15g/mL の画分に単一のピークを示し、電子顕微鏡観察より均一な径を持つ粒子であることが判明した。また、VLP を BALB/c マウスに免疫した血清が中和活性を示すことを確認した。以上から、ウイルスチャレンジ実験を行い、VLP のワクチン有効性を検証する段階まで到達できたと考えられる。

A. 研究目的

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。平成 17 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、平成 18 年度は粒子形態と中和エピトープについて調べた。今年度は、VLP 抗原産生細胞株樹立を試みた。

VLP 持続発現 CHO 細胞クローンの樹立

(ア) ATCC より購入した CHO-K1 (CCL-61)細胞

へ prM-E 発現ベクター(図 1A, No.12)を導入した。

- (イ) 遺伝子導入細胞を限界希釈後、プラスタサイジン薬剤選択を行い、prM-E 持続発現細胞クローンを樹立した(図 1A, #22)。
- (ウ) 培地上清の ELISA により VLP 産生量の大きい細胞クローンを選抜した(図 1A, #22.6)。選択したクローンより再度クローニング操作を行い、さらに VLP 産生量の大きいクローンの選択を試みた(図 1A, #22.6.6)。
- (エ) 選択した細胞クローンの E 抗原発現を間接蛍光抗体法により観察した。細胞継代時、

定期的に培養上清の回収を行い、VLP 発現量の定量を行った。

無血清培地への馴化

- (ア) 樹立した VLP 持続発現 CHO-K1 細胞クローン(図 1, #22.6, #22.6.6)について、通常の 10%FBS を含有する培地へ無血清培地を混合した培地で継代を行った。
- (イ) 継代毎に FBS 含有培地の比率を下げ、最終的に完全に無血清培地に置換して継代を繰り返した(図 1 B, #22.6S, #22.6.6S)。

CHO 細胞クローン由来 VLP の性状解析：

- (ア) 培養上清の超遠心ペレットを、VLP 発現細胞ライセートとともに SDS-PAGE し、抗 JEV 抗体および抗 WNV-M 抗体を用いたウエスタンブロット法により解析した(図 2)。
- (イ) 培養上清を 45%ショ糖クッション下で超遠心沈降、20-60%ショ糖平衡密度勾配により分画、さらに 10-45%ショ糖平衡密度勾配により分画した。最終的にゲル濾過でショ糖を除き、限外濾過で濃縮して精製 VLP とした。
- (ウ) (イ)でショ糖密度勾配により分画したフラクションを抗 WNV E モノクローナル抗体を用いた ELISA により定量した。また、精製 VLP はローリー法により総タンパク量を定量した。
- (エ) 精製 VLP をネガティブ染色法により電子顕微鏡観察した。

中和抗体誘導能の解析

- (ア) VLP 産生 CHO 細胞クローンのうち、FBS 含有培地継代クローン(図 1, #22.6)、無血清培地馴化クローン(図 1, #22.6S)の 2 種類について培養上清より VLP を精製した。
- (イ) BALB/c マウスへ 1 週間の間隔をあけて VLP を 2 回腹腔内投与した。コントロール

にホルマリン不活化した WNV 粒子、および PBS を投与した。

- (ウ) 2 回目の抗原免疫 1 週間後に採血を行い、血清サンプルを調整した。
- (エ) 各群について、各個体より等量ずつプールした血清の中和抗体価を、プラーク減少法により解析し、50%プラーク形成阻害を示す血清希釈率(PRNT₅₀)を求めた。

(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) 遺伝子導入後の薬剤選択により樹立した CHO 細胞クローンから VLP 産生量の大きいクローンを選択した(図 1A #22)。さらに再クローニングを行い VLP 産生量のより大きいクローンを選択した(図 1A #22.6)。2 度目の再クローニングで、得られたクローン(図 1A #22.6.6)の VLP 産生量は 1 度目の再クローニングを超えなかった。
- (イ) 樹立したクローン(図 1 #22.6, #22.6.6)を無血清培地へ馴化させた結果、細胞は付着培養系より浮遊培養系へと変化した(図 1B #22.6S, #22.6.6S)。無血清培地へ馴化した細胞はさらにタンパク質不含培地でも継代可能であることが分かった。
- (ウ) 樹立した細胞クローンを 50 代以上継代したが VLP 産生量は低下しなかった。また、抗 WNV E 抗体を用いた間接蛍光抗体法で観察したが、細胞クローンはほぼ 100%の確率で抗原陽性であった。
- (エ) ウエスタンブロット法による解析で、細胞内での E, prM および M 抗原の発現は感染細胞ライセートと VLP 発現 CHO 細胞クローン、および無血清培地馴化クローンでそれぞれ発現量の比やプロセッシングに差が見ら

れたものの、培養上清超遠心ペレットには、すべてのクローンで成熟した E, M タンパク質を確認できた(図 2)。

(オ) ショ糖密度勾配による解析により、CHO 細胞クローン由来の VLP は、比重 1.15g/mL 付近のフラクションに単一のピークを示した。

(カ) 電子顕微鏡による観察により、CHO 細胞クローン由来の精製 VLP は直径 25nm 程度のサイズの均一な粒子を形成していることを確認した。

(キ) 不活化ウイルス同様、VLP を免疫した血清は WNV によるプラーク形成を阻害できることを確認した。

D. 考察

VLP を恒常的に発現する CHO 細胞クローンの樹立、CHO 細胞クローンの無血清培地やタンパク質不含培地への馴化に成功した。血清成分、およびタンパク質成分を培地中に含まないことは、生物学的汚染リスクを除いた、安全性の極めて高いワクチン抗原作製を可能にするという点で重要であると考えられる。

細胞クローン樹立後にクローニングすることで、VLP 産生量の大幅な改善が可能であることが判明した。無血清培地への馴化を行うと、浮遊培養系へと変化したことは、工業的に大量生産する場合、大きなメリットになると考えられる。ショ糖平衡密度勾配および電子顕微鏡観察の結果より、CHO 細胞クローン由来 VLP は比重 1.15g/mL の、直径 25nm サイズを持つ粒子を形成していることが分かった。

細胞クローンより産生された VLP はウエスタンブロット法で成熟した E, M 抗原を確認でき、2 種類の抗 WNV 中和活性を持つモノクローナル抗体を用いた ELISA でも反応性を示した。

加えて CHO 細胞クローン由来 VLP を BALB/c マウスへ免疫した血清が中和活性を持っていた

ことが確認されたため、CHO 細胞クローン由来 VLP は中和抗体を誘導できるサブユニットワクチン候補として有望であると考えられる。ただし、ウイルスチャレンジ実験などのワクチン有効性の判定や、抗原精製法の確立には今後の解析を進める必要がある。

E. 結論

WNV VLP を持続的に、かつ高効率に産生する CHO 細胞クローンを樹立し、樹立した細胞クローンを無血清培地や、タンパク質不含培地に馴化することに成功した。

これらの CHO 細胞クローンより産生される VLP は成熟した E, M タンパク質より構成され、WNV 中和抗体への反応性を保ち、また比重、サイズともに均一であることを確認した。

CHO 細胞クローン由来 VLP が BALB/c マウスに対して WNV 中和抗体を誘導できることが判明したため、ウイルスチャレンジ実験を行い、VLP 抗原のワクチン有効性を検証する段階まで到達できたと考えられる。

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

大滝 尚広、高橋 秀宗、田中 恵子、石川 豊数、東 雍、佐多 徹太郎、小島 朝人：ウエストナイルウイルスサブユニットワクチンの開発。第 11 回日本ワクチン学会学術集会、2007 年 12 月、横浜。

岡本成史、吉井洋紀、小島朝人、石川豊数、明石 満、高橋理明、山西弘、森 康子：ポリ- γ -グルタミン酸ナノ粒子の日本脳炎ワクチ