

ンアジュバントとしての可能性. 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、山西弘一、森 康子：アジ
ュバントとの併用による効果的な日本脳炎ワ
クチンの 1 回接種法の検討. 第 55 回日本ウイ
ルス学会学術集会、2007 年 10 月、札幌.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許出願

「ウエストナイルウイルスワクチンおよびその
製造方法」、平成 19 年 11 月 7 日出願（発明
者：小島朝人、高橋秀宗、他）

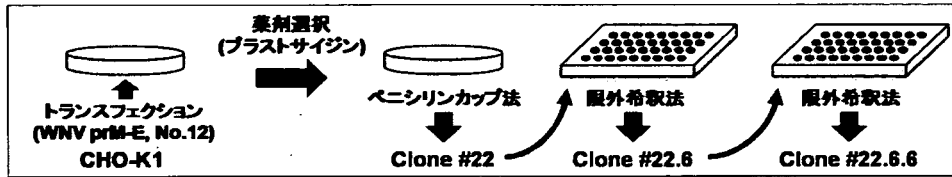
「フラビウイルス感染症ワクチンおよびフラビ
ウイルス感染症ワクチン用アジュバント」、
平成 19 年 12 月 21 日出願（発明者：小島朝
人、他）

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 VLP 持続発現 CHO 細胞クローンの樹立

(A) prM-E 遺伝子導入後、WNV-VLP を持続的に産生する、CHO-K1 細胞クローンの樹立を試みた培養上清への E 抗原産生量が最大のクローンを次のクローニングに用いた。



(B) 樹立した各クローンを培地変更することで、VLP を産生する、FBS 非要求性の CHO 細胞クローンを作製した。無血清培地馴化後、細胞は浮遊培養系へ変化した。

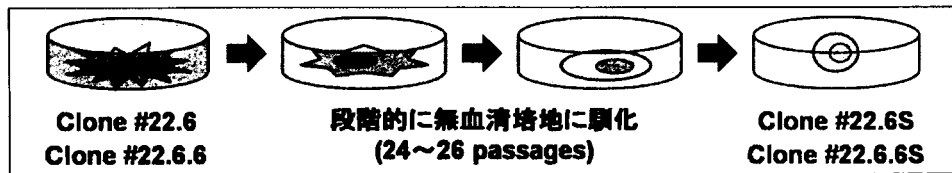
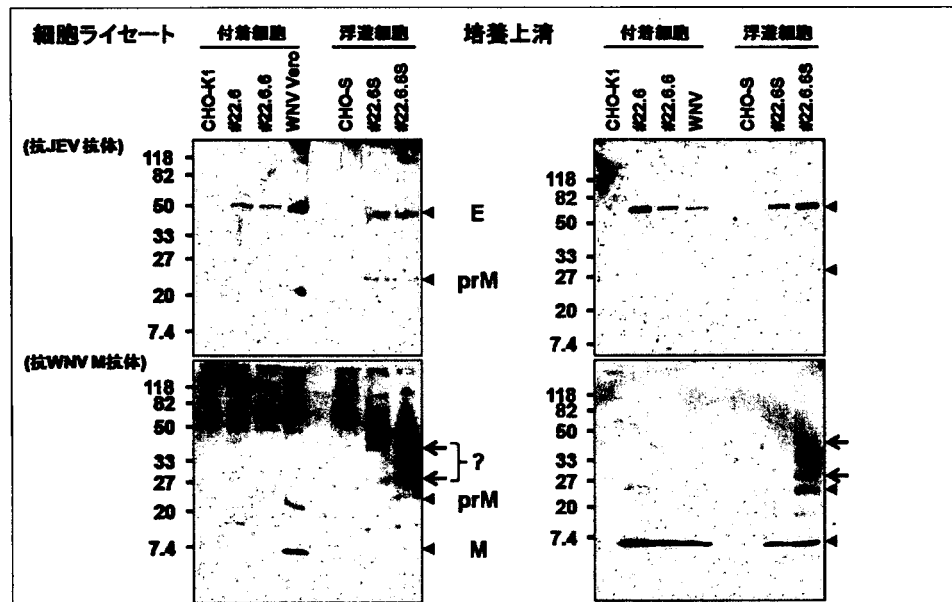


図2 prM-E 持続発現 CHO 細胞クローンについて、細胞内および培養上清の抗原プロセッシングをウエスタンブロット法により解析した



厚生労働省研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）
分担研究報告書

アジュバント併用による効果的な日本脳炎ワクチン1回接種法の検討

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 (JE) ワクチンは JE 流行地域への渡航のためのトラベラーズワクチンとしての需要などもあり、1回接種で十分な感染防御効果を示すワクチン改良の検討が望まれる。しかしその点を詳細に検討した報告は少ない。我々は、既存の JE ワクチンを用いてアジュバント併用によるワクチンの1回接種法の有用性の検討についてマウスを用いて行った。JE ワクチンの1回接種後の中和抗体価は2回接種時の約10分の1であり、JEV 感染に対する生存率は50%に留まった。一方、同ワクチンにアジュバントとして水酸化アルミニウムゲルないしポリ- γ -グルタミン酸ナノ粒子を加えることで1回接種後の中和抗体価が2回接種時のレベルに上昇し、生存率も100%となった。以上の結果より、各種アジュバントとの併用により十分な感染防御効果を有する JE ワクチンの1回接種法の可能性が示唆された。

A. 研究目的

日本脳炎 (JE) の発症予防の唯一の手段はワクチン接種である。現行の日本脳炎不活化ワクチンは、効果的な防御効果を示すためには複数回の接種が必要とされており、被験者の負担や経済性などの問題などから1回接種で十分な防御効果を示す新しい日本脳炎ワクチンの接種方

法が望まれている。我々は、アルミアジュバント (alum) およびポリ- γ -グルタミン酸ナノ粒子 (γ -PGA-NPs) をアジュバントとして併用させた日本脳炎ワクチン1回接種によるワクチン効果の有用性について検討を行った。

B. 研究方法

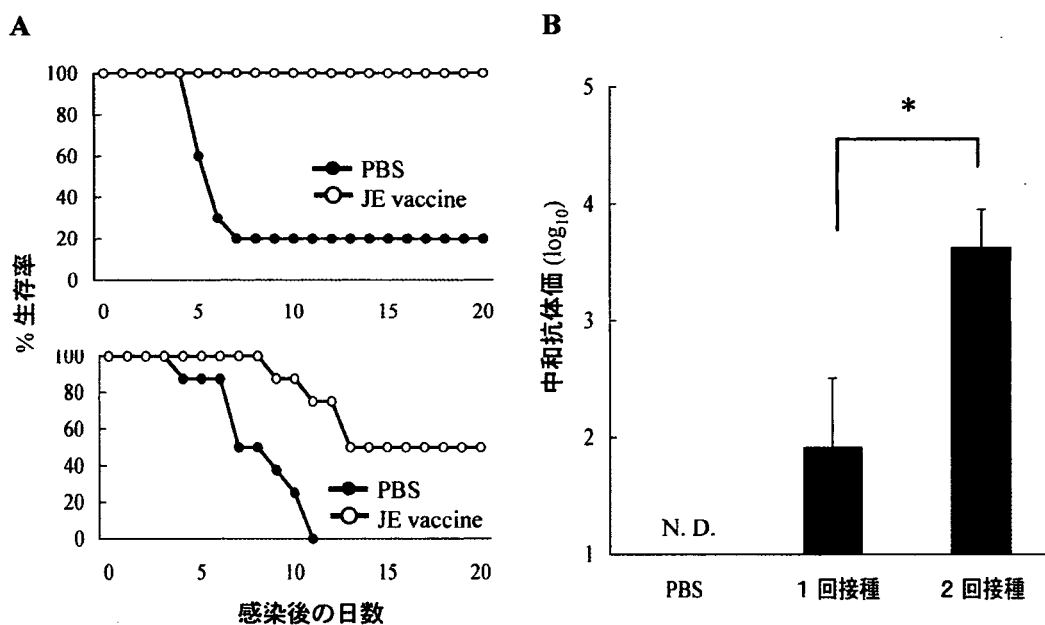


図1 JE ワクチンの接種回数による防御免疫効果の変化. JEワクチンの2回接種(上)と1回接種(下)でのJEV感染に対する生存率の変化 (A)と抗JEV中和抗体価 (B)を示す. *, $p < 0.05$, N.D.; 検出限界以下.

1. 材料

現行のJE ワクチンである不活化JE ワクチン原液(北京株)、ウイルス攻撃試験用のJE ウイルス (JEV) (JaTH 160 株)、alum は、(財) 阪大微生物病研究会から供与された。γ-PGA-NPs は、大阪大学大学院工学研究科で作製された。

2. 接種方法および血清採取

BALB/c マウス (雌、4 週齢) に現行のJE ワクチン (1 μg) をalum (100 μg) あるいは γ-PGA-NPs (100 μg) にて混合接種、もしくはJE ワクチンのみ1回、腹腔内接種を行った。接種15日後に各マウス

から採血、血清を分離し、非働化処理を行い、抗JEV 中和抗体価測定に供した。

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、接種15日後にJEV JaTH 160 株 (mouse LD₅₀ = 10⁴ pfu) を 3 x 10⁵ pfu 腹腔内より感染させた。そして接種後のマウスの生存率の変化を観察した。

C. 研究結果

1. JE ワクチンの単独1回接種による感染防御効果の変化

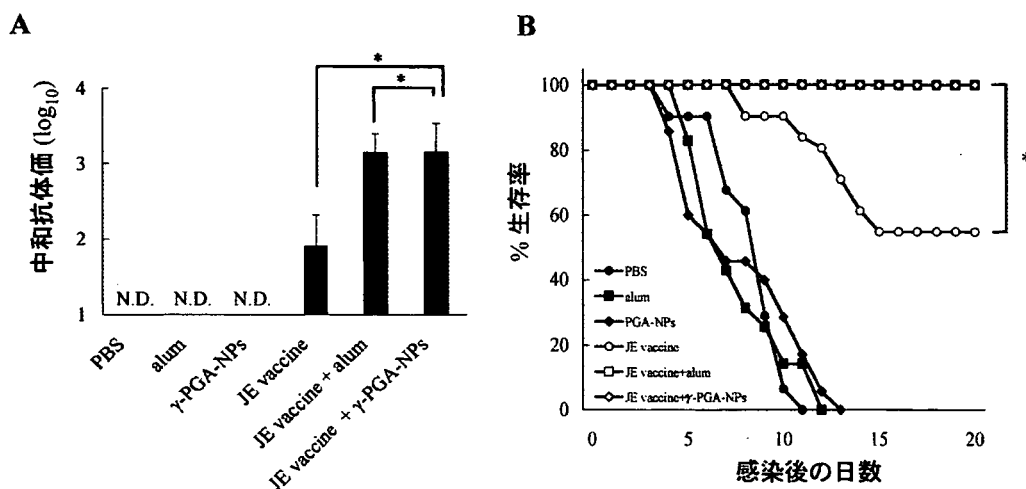


図2 JEワクチンとアジュバントとの併用1回接種による防御免疫効果の変化. A. 抗JEV中和抗体価, B. JEV感染に対する生存率. *, $p < 0.05$, N.D.; 検出限界以下.

JE ワクチンを1週間間隔で2回接種したマウスでは、初回接種から15日後にJEVを感染させても全匹感染死を免れた。しかし、JEワクチンを1回接種したマウスについては、JEV感染に対して50%のマウスが死亡した(図1A)。また、ワクチンを1回接種したマウス血清中のJEVに対する中和抗体価は、2回接種したマウスと比較して、約10分の1以下までに低下していた(図1B)。

2. 各種アジュバントとの併用によるJEワクチン1回接種での感染防御効果の増強

JEワクチン接種時にalumもしくはγ-PGA-NPsを併用したところ、接種15日後の血清中のJEVに対する中和抗体価が、JEワクチン1回接種の場合と比べて約10倍上昇した(図2A)。また、alumおよびγ-PGA-NPsの違いによる中和抗体

価での有意な差は認められなかった。そこで、各種アジュバントとJEワクチン併用によるJEV感染に対する感染防御効果を検討したところ、アジュバントの別に関係なく全匹感染死を免れ、ワクチン単独の場合(生存率56%)と比べて有意な感染防御効果の増強を認めた(図2B)。

D. 考察

動物実験系を用いた現行のJEワクチンの1回接種での防御効果に関する報告は存在せず、同効果の是非については全く不明である。そこで、本年度では1回接種で十分な防御免疫効果を誘導する接種方法の検討を行った。その結果、JEワクチン単独での1回接種では十分な防御効果を得ることができなかったが、alumおよびγ-PGA-NPsを併用することにより十分な防御効果を誘導することを明ら

かにした。

JE に対する防御免疫は中和抗体産生による体液性免疫応答が主体であるとされている。本研究において、JE ワクチンの1回免疫での低い感染防御効果および各種アジュバントの併用による感染防御能の増強とそれぞれの中和抗体価との間には正の相関性が認められた。この点でアジュバントによる1回接種での有効な感染防御効果には体液性免疫応答が関与している可能性が考えられる。一方、防御効果増強における細胞性免疫応答の関与の可能性について未だに不明であり、更なる検討が必要と思われる。

今回使用した alum は、臨床で使用できる数少ないアジュバントである。このことは、現行の JE ワクチンと alum による1回接種法、もしくは alum との併用による現行より少ないワクチン接種量での複数回接種法が臨床試験などに応用しやすいことを意味するものであり、早い段階での臨床応用への検討が期待できる。

E. 結論

1. JE ワクチンの単独1回接種では JEV に対する十分な感染防御効果を得ることができなかった。
2. JE ワクチンに alum あるいは γ -PGA-NPs を併用接種することにより、十分な感染防御効果が得られた。
3. アジュバントとの併用接種による JEV 感染に対する防御効果の増強に

JEV に対する中和抗体価の増強が関与することが考えられる。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Okamoto, S., Yoshii, H., Ishikawa, T., Akagi, T., Akashi, M., Takahashi, M., Yamanishi, K., Mori, Y. Single dose of inactivated Japanese encephalitis vaccine with poly(γ -glutamic acid) nanoparticles provides effective protection from Japanese encephalitis virus. *Vaccine* 26:589-594, 2008.

2. 学会発表

1. 岡本成史、吉井洋紀、小島朝人、石川豊数、明石 満、高橋理明、山西弘一、森 康子 アジュバントとの併用による効果的な日本脳炎ワクチンの1回接種法の検討 第 55 回日本ウイルス学会学術集会 (札幌) 2007 年 10 月 21-23 日

2. 岡本成史、吉井洋紀、小島朝人、石川豊数、明石 満、高橋理明、山西弘一、森 康子 ポリ- γ -グルタミン酸ナノ粒子の日本脳炎ワクチンアジュバントとしての可能性 第 11 回日本ワクチン学会学術集会 (横浜) 2007 年 12 月 8-9 日

H. 知的財産権の出願 登録状況

1. 特許出願

発明の名称：ウイルス感染症ワクチンお

よびフラビウイルス感染症ワクチン用ア
ジュバント 発明者:森 康子、岡本成史、
吉井洋紀、山西弘一、小島朝人、赤木隆
美、明石満、石川豊数、高橋理明. 特許
出願人:独立行政法人医薬基盤研究所、
国立感染症研究所長、国立大学法人大阪
大学、財団法人阪大微生物病研究会 出
願番号:特願 2007-330151 出願日:
2007年12月21日

2. 実用新案登録

なし

「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
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 部長）

協力研究者：岩田奈織子（国立感染症研究所 感染病理部 主任研究官）

永田典代（国立感染症研究所 感染病理部 主任研究官）

辻 隆裕（国立感染症研究所 感染病理部 第二室研究員）

佐藤由子（国立感染症研究所 感染病理部 第一室研究員）

長谷川秀樹（国立感染症研究所 感染病理部 第二室長）

研究要旨：ウエストナイルウイルスの感染病態と開発中のワクチン、治療薬の効果を評価するための動物モデル系の作製を BALB/c マウスで試みた。BALB/c に NY99/6922 株を静脈内あるいは皮下に接種すると、弛緩性麻痺、脳炎症状、腹部膨満を伴う食欲低下あるいは一過性の体重減少、と種々の病態を示した。一過性の体重減少と神経症状を示した個体において、ウイルス感染に伴う軽度～重度の脳炎あるいは脊髄炎、髄膜炎所見を病理学的に確認した。腹部膨満を示した個体では、腸管の神経叢に壊死とそれに伴う軽度な炎症所見が得られたが、ウイルス感染との関連は不明であった。さらに、リンパ系組織において感染性のウイルスの存在とアポトーシスの所見が得られ、感染に伴うリンパ系への病原性が示唆された。本モデルにおいてワクチン、治療薬の効果を評価するためには、経日的な体重、臨床症状の観察あるいは最終的な病理学的解析は有用な判定方法である。

A. 研究目的

ウエストナイル熱・脳炎が日本に侵入した場合に備え、臨床検体の病理学的診断法の確立、動物モデルを用いたウエストナイルウイルス(WNV)による神経病変の病態解明および、ワクチン評価のための動物モデルの作製を目的とした。

B. 研究方法

本年度は、これまで本研究班で行った、

WNV(NY99/6922株)のLD₅₀算出の再試験で
使用した静脈内 (8×10^1 - 8×10^5 pfu/head, n=5-7) あるいは皮下接種 (4×10^2 - 4×10^6 pfu/head, n=5-6)を行った8週齢、雌のBALB/cマウスの病理材料を用いて、臨床症状と組織病変の関連について詳細な病理学的検討を行った。マウスは、ウイルス接種後21日間経過を観察し、途中瀕死あるいは死亡した個体はその時点で病理解剖を行った。生残した動物はすべて解剖に供した。

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庁舎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病原体取扱安全管理規定と、動物実験委員会規定に従い実施した。

C. 研究結果

ウイルス接種 5 日目からマウスは、体重減少、立毛などの臨床症状を示した。重症例では後肢の弛緩性麻痺、沈鬱、立毛を示す脳炎症状、あるいは腹部膨満を伴う食欲低下を示し、静脈内接種 27 匹中 25 匹、皮下接種 26 匹中 18 匹が致死性であった。残りは一過性の体重減少後、回復あるいは無症状で耐過した。材料採取が可能であった、静脈内接種群 5 匹と皮下接種群 13 匹を病理学的に検索した。

弛緩性麻痺のみられた 2 例では脊髄の神経細胞の脱落とそれに伴う炎症が(図 1 A)、脳炎症状の見られた 3 例では大脳皮質の神経細胞でウイルス抗原が陽性であり、それに伴う炎症所見が認められた(図 2 A,B)。一方で、一過性の体重減少後、回復した 4 例では、21 日目の経過観察後の解剖で、脳あるいは脊髄の一部に炎症所見が認められた(図 1 B)。同様の臨床症状のもの 1 例が、組織学的に著変はみられなかった。立毛、

腹部膨満で死亡した 3 例で、腸管上皮の壊死、リンパ球のアポトーシス(TUNEL 法により確認した)が観察され、腸管の神経叢で一部壊死所見がみられたが、その特異性は不明であった(前年度報告書参照のこと。データは示さない)。これらの個体で脳炎所見はみられなかった。

無症状で 21 日耐過した 5 例はいずれも組織変化はみられなかった。WNV 抗原陽性細胞は一週間目に死亡した個体の神経細胞にみとめられたが、9 日以降ではほとんど検出されなかった。なお、接種方法による特徴的な病変の相違はなかった。

D. 考察

神経症状を示した個体における、神経細胞でのウイルス抗原の検出時期は、ポリオウイルス等の急性神経ウイルス感染症と同様、一過性と考えられる。すなわち、ウイルス抗原が検出可能な時期は感染後 1 週間前後で、その後は炎症性細胞によって感染細胞が除去されると考えられた。また、接種後 5-8 日目に一過性の体重減少がみられ回復した個体において、軽微な脳炎、脊髄炎所見が認められたことから、回復例においても中枢神経系へのウイルスの侵入があったことが示唆された。

一方で、腹部膨満を伴う致死性病変を示した個体は、腸管の神経叢において変性、壊死、好中球の軽微な浸潤が認められたが、別に行った、経時的な材料採取による組織観察でもウイルス抗原は検出されていない。よって、ウイルス感染との明らかな関連性

は証明できなかった。同時にこれらの個体のリンパ系組織では強いアポトーシス像が認められたが、リンパ節におけるウイルス分離の結果から、このウイルスのリンパ向性は非常に高いことが明らかとなっており、感染がリンパ球に対してアポトーシス誘導等、なんらかの影響を示している可能性が示唆された。

我々が使用している NY99/6922 株は、VeroE6 細胞の感染プラークによる観察で、ヘテロの集団であることを確認している。今回認められた、BALB/c における多様な病態は、個体ごとに異なるウイルス集団が増殖した結果による可能性もあり、病原性の発揮機序を解明するためには興味深い点であった。

E. 結論

本研究班において、免疫組織化学法を用いたウイルス抗原の検出による、臨床検体の病理学的診断系を確立した。また、NY99/6922 株を静脈内あるいは皮下接種した BALB/c は、中枢神経系あるいはリンパ系、腸管系において種々の病態を示すことを明らかにした。感染量によっては、5-8 日目に元気消失と体重減少をしめし、その後回復するが、中枢神経系にウイルスは侵入していることが病理学的に明らかとなった。本モデルを用いたワクチンあるいは治療薬の効果を判定するために、毎日の体重変化、経過観察あるいは最終的な病理判定は有用な判定方法と考えられた。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

なし。

1. 論文発表

なし。

H. 知的財産権の出願、登録状況

なし。

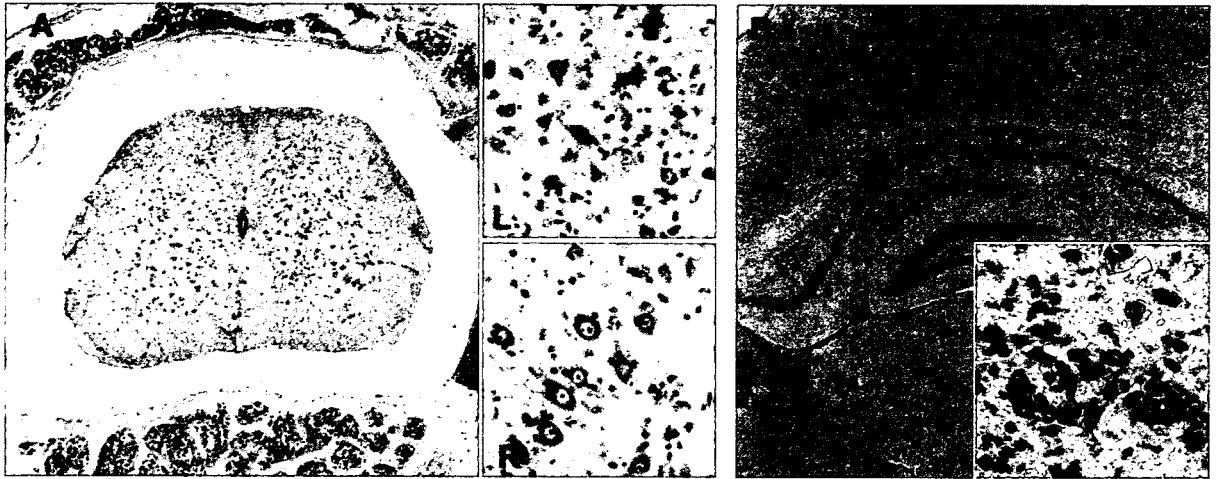


図1 A: 左後肢に弛緩性麻痺を示した個体の腰髄組織病変 (Klüver Barrera luxol fast blue 染色)。左側前角の運動神経細胞は壊死、脱落し、軽度な炎症性細胞浸潤が認められた (L)。右側の運動神経細胞は正常であった (R)。B: 一過性の体重減少が認められた個体の大脳海馬における炎症所見 (HE 染色)。海馬の神経細胞の脱落とそれに伴うミクログリアの軽度な浸潤が認められた(挿入図)。

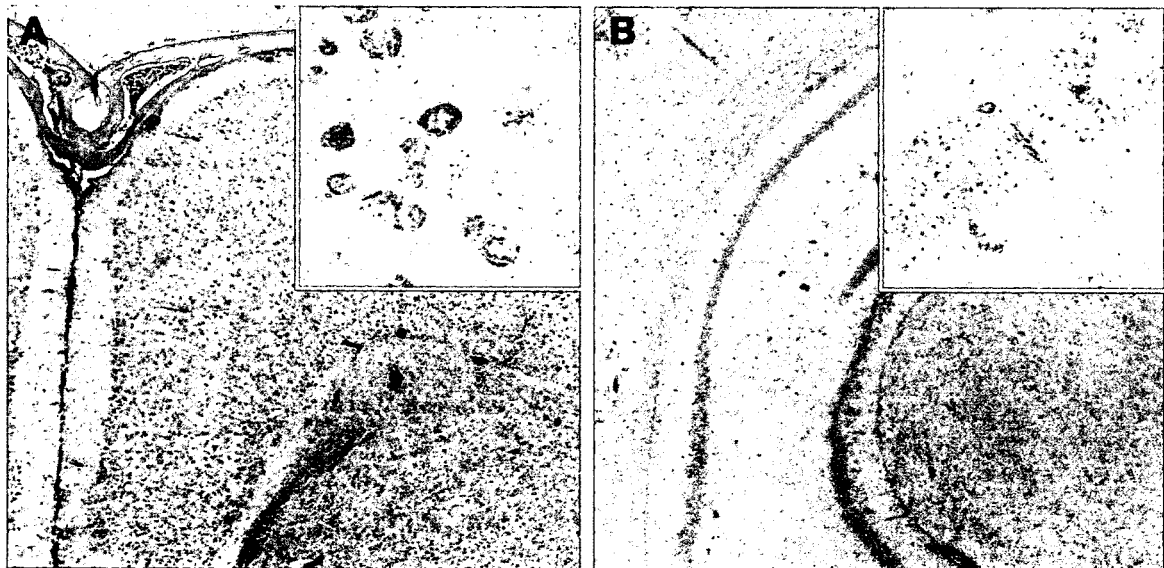


図2 脳炎症状を呈し、瀕死となった個体の大脳皮質および海馬(HE 染色。挿入図、免疫組織化学)。A: 大脳皮質の神経細胞は HE 染色において形態変化に乏しいが、この部位のほとんどの神経細胞の細胞質においてウイルス抗原が陽性であった(挿入図)。B: 海馬の神経細胞も同様に形態変化に乏しいが、ウイルス抗原が弱陽性であった(挿入図)。

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の新規検査法の開発に向けたウイルス様粒子の作製

分担研究者： 前田秋彦 北海道大学大学院獣医学研究科 准教授

協力研究者： 前田潤子、橋本新吾、苅和宏明、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)とフラビウイルスの同一血清型群に属する日本脳炎ウイルス(JEV)の感染を血清学的に鑑別する方法として、ウイルス様粒子(VLP)を用いた中和試験法の開発を企図した。本研究では、内部にWNVのレプリコンをパッケージングし、粒子の殻をWNVあるいはJEVの構造蛋白質で構成されたVLPを作製した。レプリコンの発現マーカーとして赤色および緑色蛍光色素遺伝子を導入したところ、両蛍光色素の発現が認められた。また、レプリコンの発現を定量化するために分泌型アルカリフォスファターゼ遺伝子をレプリコンに導入したところ、本レプリコンを導入した哺乳類動物細胞の培養上清中に、分泌されるアルカリフォスファターゼの経時的な増加を確認した。現在、これらのVLPを用いたフラビウイルス感染症の中和試験法を開発中である。

A. 研究目的：ウエストナイルウイルス(WNV)はフラビウイルス属の日本脳炎ウイルス血清型群に属する。したがって、WNVに対する感染血清は同一血清型群に属する日本脳炎ウイルス(JEV)の抗原と強く交差反応するため、WNVとJEVの感染を血清学的に鑑別することは困難であると考えられている。フラビウイルス属のウイルス感染を血清学的に鑑別する方法として、各ウイルスを用いた中和試験法の有効性が示されている。しかし現行の中和試験法では、生ウイルスを使用するため感染事故が起こる危険性がある。また、WNVは病原体レベル3の病原体であるため、バイオセーフティーレベル(BSL)3の実験室内で取扱わなければならない。そこで、より安全にBSL2実験室で行うことが出来るフラビウイルスの中和試験法を開発することを企図とした。本研究では、中和試験で使用する生ウイ

ルスの代替としてVLPを用いた試験法の開発を目指した。VLP感染の目安として、感染時に各種のレポーター遺伝子を発現するWNVあるいはJEVを構造蛋白質として持つVLPを作製した。

B. 研究方法：WNVレプリコンのウイルス構造蛋白質の欠失部位にレポーター遺伝子として赤色(DsRed)や緑色蛍光色素(AcGFP)遺伝子(図1A)あるいは分泌型アルカリフォスファターゼ(SEAP)遺伝子(図2A)を組み込んだ(それぞれrepWNV/NY/DsRed、repWNV/NY/AcGFPおよびrepWNV/NY/SEAP)。これらのレプリコンをBaby hamster kidney (BHK)、HEK293T(293T)あるいはVero細胞に導入し、その発現を確認した。更にWNVあるいはJEVの構造蛋白質を発現するプラスミドベクター(それぞれpCAGGS WNV SGおよびpCAGGS JEV SG)と各レプリコン

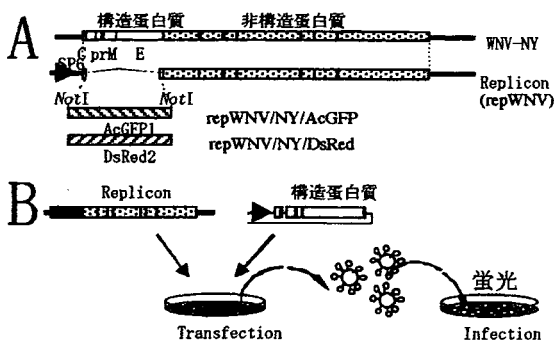


図1. 蛍光蛋白質をレポーター遺伝子とするレプリコンの構築とウイルス様粒子の作製
 A. WNVの構造蛋白質をコードする遺伝子の欠損部位に赤色(DsRed)あるいは緑色(AcGFP)蛍光色素蛋白質遺伝子を導入した。B. これらのレプリコンとWNVの構造蛋白質を細胞に共発現することで、蛍光色素蛋白質発現VLPを作製した。

を共発現させることにより、VLPの産生について検討した。DsRed および AcGFP の発現を蛍光顕微鏡下で確認した。また、SEAP の発現を Great EscAPE SEAP Chemiluminescence Detection Kit (BD Biosciences)を用いて定量化した。

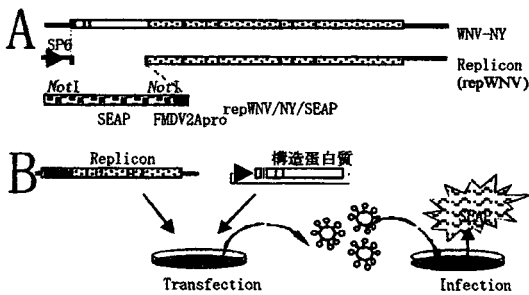


図2. 分泌型アルカリフォスファターゼ(SEAP)をレポーター遺伝子とするレプリコンの構築とウイルス様粒子の作製
 A. WNVの構造蛋白質をコードする遺伝子の欠損部位にSEAP遺伝子を導入した。B. このレプリコンとWNVの構造蛋白質を細胞に共発現することで、SEAP蛋白質発現VLPを作製した。

C. 研究結果：

1) 蛍光色素発現 VLP の作製

蛍光色素発現レプリコン、repWNV/NY/DsRed あるいは repWNV/NY/AcGFP を BHK、293T あるいは

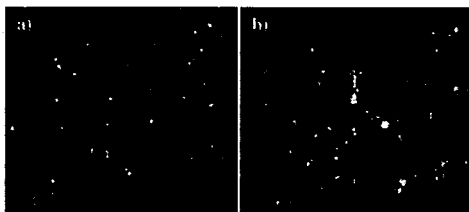


図3. 蛍光蛋白質発現レプリコンのレポーター遺伝子の発現
 赤色(DsRed, a) および緑色(AcGFP, b) 蛍光蛋白質発現 WNVレプリコン(repWNV/DsRedおよびrepWNV/AcGFP)を細胞に導入し、72時間後にレポーター遺伝子の発現を蛍光顕微鏡で観察した。

Vero 細胞に導入したところ、48~72 時間後に各細胞で、それぞれの蛍光色素の発現が観察された(図3)。次に、WNV の構造蛋白質の殻を持つ VLP(WNV/Red-VLP) を作製するために、WNV の構造蛋白質を発現するプラスミドと WNV レプリコンを BHK 細胞に共発現させる(図1B)と、培養上清中に VLP が分泌され、VLP 価は 72 時間後に最大に達した(図4)。一方、JEV の構造蛋白質の殻を持つ VLP(JEV/Red-VLP) を作製するため、JEV の構造蛋白質を発現するプラスミドと WNV レプリコンを BHK 細胞に共発現させた場合、VLP 価は 48 時間後に最大に達した(図4)。しかし、WNV-VLP と JEV-VLP の最大 VLP 価に差は認められなかった(図4)。

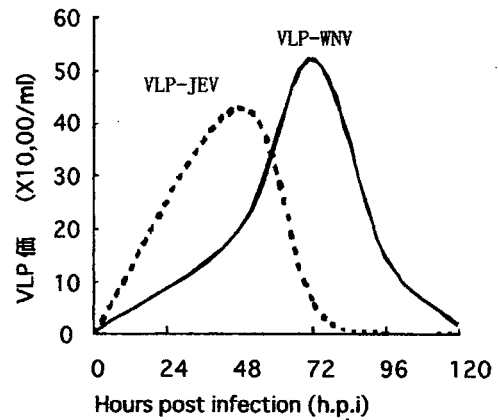


図4. 赤色蛍光色素蛋白質(DsRed)発現VLP感染による DsRedの発現
 repWNV/DsRedをWNVあるいはJEVの構造蛋白質と共発現することにより、WNVあるいはJEVの構造蛋白質の殻を持つVLP(それぞれVLP-WNV/DsRed(実線)、VLP-JEV/dsRed(破線))産生の経時的増加を観察した。

2) SEAP 発現 VLP の作製

repWNV/NY/SEAP を WNV の構造蛋白質発現プラスミドと共に BHK 細胞に導入し、SEAP 発現 VLP を作製した(図2B)。SEAP 発現 VLP を Vero 細胞に感染し、経時的に培養上清中に放出された SEAP 量を測定したところ、感染細胞からの SEAP 分泌の経時的な増加が認められた(図5)。

D. 考察

現行のフラビウイルス感染症の鑑別診断として最も有効とされているのは、ウ

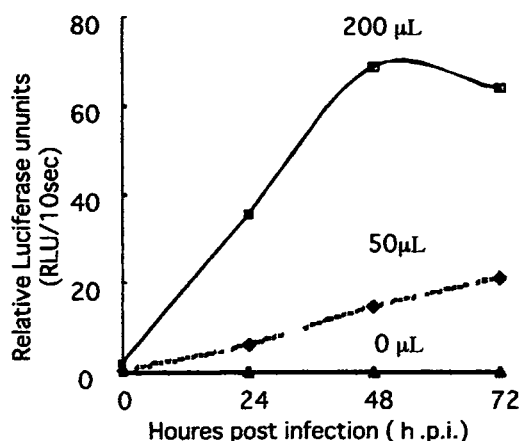


図5.分泌型アルカリフォスファターゼ(SEAP)発現VLP感染によるSEAPの発現

分泌型アルカリフォスファターゼ(SEAP)遺伝子をレポーターとするVLP(VLP-WNV/SEAP)を各200(■)、50(◆)、0(▲)μL細胞に感染し、経時的に培養上清中に分泌されるSEAP量を測定した。

イルスの中和試験である。しかしフラビウイルス中和試験は、抗血清による生ウイルスの50%プラーク減少法として行われている。生ウイルスを使用する場合、WNVはBSL3実験室での使用が義務付けられており、感染事故が起こる危険性がある。そこで、生のウイルス粒子に構造や抗原性が類似するVLPを生ウイルスの代替として中和試験に使用できるか否かについて検討するため、本研究では各種のレポーター遺伝子を有するWNVのレプリコンを内包するVLPを作製した。レポーター遺伝子の挿入部位として、過去に報告のあるレプリコンの3'非翻訳領域を選んだところ、レプリコンの転写効率が低下した(データは示さず)。次に、WNVレプリコンのウイルス構造蛋白質の欠失部位にレポーター遺伝子のみをin frameに挿入した場合、レプリコンの転写効率は元のレプリコンと同程度であった(データは示さず)。そこで、WNVレプリコンのレポーター遺伝子の挿入部位として、ウイルス構造蛋白質の欠失部位を選んだ。レポーター遺伝子として、二種類の蛍光色素を異なるVLPに付与(例えばJEVの殻を持つVLPに赤色蛍光色素遺伝子をWNVの殻を持つVLPに緑色蛍光色素遺伝子をレポーター遺伝子)しておけば、両VLPを容易に区別できるものと考えられ

た。今回作製したWNVレプリコンは、WNVの構造蛋白質の殻ばかりでなくJEVの構造蛋白質の殻にも、同程度パッケージングされることが明らかとなった(図4)。これは、両ウイルスが同一血清型群に属するためであると考えられるが、他の血清型群に属するフラビウイルスの構造蛋白質を共発現させた場合の、WNVレプリコンのパッケージング効率についても検討する必要がある。

またVLPを用いた検査法をより簡便化し定量化するため、SEAP発現VLPを作製した。本VLPを使用することで、(レプリコンの発現を指標とした)VLPの感染をSEAPの産生量として定量化できる。本法では、生ウイルスを用いた場合の50%プラーク減少法や蛍光色素発現VLP感染による蛍光蛋白質発現細胞の50%減少法を用いた中和試験法に比べ簡便であるため、より汎用性があるものと考えられた。

E. 結論

今回、各種のレポーター遺伝子を発現するWNVのVLPの作製に成功した。これらのVLPを使用することで、安全で簡便なWNV感染症の検査法を開発できるものと期待された。また、日本においてはWNVと近縁のJEVが存在するため、WNVとJEV感染症の血清学的な鑑別にも応用可能であると考えられた。

F. 健康危険情報

特に無し。

G. 研究発表(発表誌名巻号・頁・発行年)

1. 論文発表

- 1) Maeda, A., Maeda, J., Takagi, H., and Kurane, I. Detection of small RNAs containing the 5'- and the 3'-end sequences of viral genome during West Nile virus replication. *Virology* 371: 130-138, 2008
- 2) Maeda, J., Takagi, H., Hashimoto, S., Kurane, I., and Maeda, A. A

PCR-based protocol for generating West Nile virus replicons. *J. Virol. Methods* 148 : 244-252, 2008

- 3) Zheng, K., Zhou, H.-Q., Yan, J., Ke, C.-W., Maeda, A., Maeda, J., Takashima, I., Kurane, I., Ma, H., and Xie, X.-M. Molecular characterization of the E gene of dengue virus type 1 isolated in Guangdong Province, China, in 2006. *Epidemiology and Infection* In press 2008

2. 学会発表

- 1) 前田秋彦、前田潤子、高木弘隆、堀内基広、倉根一郎 ウエストナイルウイルスのマイナス鎖 smallRNA の合成 第54回日本ウイルス学会、名古屋 (2006. 11) 前田秋彦、前田潤子、橋本新吾、高木弘隆、高島郁夫、倉根一郎 ウエストナイルウイルス E 蛋白質糖鎖付加のウイルス粒子形成と細胞変性効果への影響 第42回日本脳炎ウイルス生態学研究会、石川 (2007. 6)
- 2) 浅川満彦、大沼学、吉野智生、佐々木均、前田秋彦、長嶺隆、天野洋祐、伊東孝、斉藤美加、外平友佳理、村田浩一、桑名貴 酪農学園大学野生動物医学センターWAMCにおける野鳥病原体感染のリスク評価研究 (概要紹介) 第13回日本野生動物医学会、岩手 (2007. 9)
- 3) 前田潤子、高木弘隆、倉根一郎、高島郁夫、前田秋彦 中空ウイルス粒子を用いたウエストナイルと日本脳炎ウイルスに対する感染血清の鑑別 第144回日本獣医学会、江別 (2007. 9)
- 4) 前田秋彦、前田潤子、高木弘隆、高島郁夫、倉根一郎 2006年、中国・広東省で分離されたデングウイルスの分子疫学 第55回日本ウイルス学会、札幌 (2007. 9)

H. 知的財産権の出願・登録状況

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

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	高崎 智彦	国立感染症研究所ウイルス第一部二室	室長
	藤井 克樹	国立感染症研究所ウイルス第一部	大学院生
	北浦 一孝	国立感染症研究所ウイルス第一部	大学院生

研究要旨： 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た。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て、国内においても今後脅威な存在と認識すべき感染症である。一般的に、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、タイラーウイルスや、マウス肝炎ウイルスなどの例では、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。本研究では、WNV感染マウス脳炎モデルを用いて、WNV感染時における中枢神経障害のメカニズムを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、脳炎発症に伴って脳内浸潤T細胞の詳細な解析を行った。その結果、感染10日目の脳内には特徴的なT細胞レセプター(TCR)レパトアの偏りが観察された。さらに、偏りのあった各レパトアは高いclonalityが存在している事が観察された。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。また、感染後の脳内におけるサイトカインの発現についてリアルタイムPCR解析した結果、感染後にIFN γ 、IL-2、TNF α の増加が経時的に認められた。以上の事から、近交系マウスを用いたWNV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同一もしくは近似したWNV関連エピトープを認識している事が示唆された。さらに、脳内に浸潤したT細胞がTh1/Tc1タイプであることが明らかとなった。

A. 研究目的

WNV感染時に脳内に浸潤するT細胞の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タイピングを行ない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

(1) 動物感染実験： 使用したWNVはNY99-6922株を使用し、感受性が高いことが知られるC3H/HeN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った。(2) サンプル採取および病理学的検討： NY99-6922株をマウスに30LD₅₀腹腔内接種し、経時的に脳を採取した。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。

(3) 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、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 を行なった。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 を固相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。

(4) T 細胞 clonality および CDR3 シークエンス解析： WNV 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、WNV 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。

(5) リアルタイム PCR： CD3、CD4、CD8、IFN γ 、IL-2、IL-4、IL-5、IL-10、TNF α 、IL-17a、IL-17f、T-bet、GATA3、FOXP3、ROR γ t の発現について解析した。

(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 感染系で以下の検討を終了した。

(1) 感染 10 日目の脳内には 3 個体に共通した特徴的 TCR レパトアの偏りとして、V α 1-1、V α 2-1、V β 5-2、V β 8-2、V β 11-1、V β 16-1 を認めた。また、偏りが認められた TCR レパトアに対して、CDR3 size spectratyping により clonality を検討した結果、V α 1-1、V α 1-2、V α 2-1、V β 5-2、V β 8-2、V β 15-1 において、高い clonality が認められた。これらのうち、CDR3 アミノ酸配列の解析では、V α 1-1、V α 2-1 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 に関しては高頻度で共通した TCRJ 領域の使用を認めた。

(2) リアルタイム PCR による脳浸潤 T 細胞の機能的な解析を行った結果、感染が進むにつれて CD3、CD8、INF γ 、IL-2、TNF α の上昇が認められ、Th1/Tc1 タイプであることが確認された。また WNV エンベロープに対する特異的プライマーを用いて、組織中に存在したウイルス RNA 量を検討した結果、脳内に多数のウイルスが存在することも確認された。

D. 考察

WNV 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 WNV 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。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事から、WNV-specific T 細胞であると考えられた。これら WNV-specific T 細胞の病態への関与は今後の検討によるが、リアルタイム PCR によるサイトカインの脳内発現での結果から、Th1/Tc1 タイプの免疫状態が惹起されている。このような結果から、WNV 感染後の脳内浸潤 T 細胞は感染細胞の排除に関与す

る可能性が示唆された。

E. 結論

今回の解析から、WNV 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。昨年度に報告した日本脳炎ウイルス感染モデルの結果と比較すると、脳内浸潤した T 細胞の TCR レパトアは WNV のそれとは異なっており、これらウイルス間の特性が強く反映された。

F. 健康危険情報

特記事項なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

Fujii Y, Kitaura K, Nakamichi K, Takasaki T, Suzuki R, Kurane I.: Accumulation of T-cells with selected T-cell receptors in the brains of Japanese encephalitis virus-infected mice. *Jpn J Infect Dis.* 2008; 61(1):40-8.

2. 学会発表

日本脳炎ウイルス感染マウスにおける脳内浸潤細胞の T cell receptor レパトア解析
藤井克樹^{1,2,3)}、北浦一孝^{1,2,3)}、高崎智彦¹⁾、鈴木隆二³⁾、倉根一郎^{1,2)} (国立感染症研究所¹⁾、筑波大院人間総合科学研²⁾、独立行政法人 国立病院機構 相模原病院 臨床研究センター³⁾)
第 55 回日本ウイルス学会学術集会 2007 年 10 月

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

研究成果の刊行に関する一覧表レイアウト

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
S. Okamoto, H. Yoshihii, T. Ishikawa, T. Akashi, M. Takahashi, K. Yamamoto, Y. Mori	Single dose of inactivated Japanese encephalitis vaccine with poly(γ -glutamic acid) nanoparticles provides effective protection from Japanese encephalitis virus	Vaccine	26	589-594	2008
Maeda, A., Maeda, J., Takagi, H., and Kurane, I.	Detection of small RNAs containing the 5'- and the 3'-end sequences of viral genome during West Nile virus replication.	Virology	371	130-138	2008
Maeda, J., Takagi, H., Hashimoto, S., Kurane, I., and Maeda, A.	A PCR-based protocol for generating West Nile virus replicons.	J. Virol. Methods	148	244-252	2008
Zheng, K., Zhou, H.-Q., Yan, J., Ke, C.-W., Maeda, A., Maeda, J., Takashima, I., Kurane, I., Ma, H., and Xie, X.-M.	Molecular characterization of the E gene of dengue virus type 1 isolated in Guangdong Province, China, in 2006.	Epidemiology and Infection	In press		2008
Fujii Y, Kitaura K, Nakamichi K, Takasaki T, Suzuki R, Kurane I.	Accumulation of T-cells with selected T-cell receptors in the brains of Japanese encephalitis virus-infected mice.	Jpn J Infect Dis.	61	40-48	2008

<p>Lim, C.K., Takasaki, T., Kotaki, A., Kurane, I.</p>	<p>Vero cell-derived inactivated West Nile (WN) vaccine induces protective immunity against lethal WN virus infection in mice and shows a facilitated neutralizing antibody response in mice previously immunized with Japanese encephalitis vaccine.</p>	<p>Viriology</p>	<p>In press</p>	<p>In press</p>	<p>2008</p>
--	---	------------------	-----------------	-----------------	-------------