

いて85種類1,053個の溜水環境を調べ、有水率76.5%、幼虫生息率26.9%であった。蚊の種類としては、WNVの媒介に関与するアカイエカが県下の一般民家、公共施設、大規模公園、その他の地点で多数採集された。WNVの感受性が高いヒトスジシマカの幼虫は多くの場所に分布し、しかも多数生息していることが示唆された。地点別には、一般民家の幼虫生息率・有水率が比較的高かった。

2006～2007年の2年間で、カラスのねぐら周辺、一般住宅、富山空港および畜舎で捕集した計18,493個体(1,050プール)の蚊についてウイルス分離を行った。その結果、WNVは検出されなかったが、10プールからI型のJEVが分離された。カラスおよびコウモリからはWNVおよびJEVに対する抗体は検出されなかった。蚊のウイルス保有調査と野生動物の抗体調査を総合すると、県内におけるWNVの浸淫の可能性は少ないと考えられる。

F. 研究危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

- 1) 小原真弓、長谷川澄代、滝澤剛則、堀元栄詞、岩井雅恵:富山県内の蚊媒介性ウイルス調査(2005年):第54回日本ウイルス学会学術集会、名古屋市、2006年11月

- 2) 小原真弓、渡辺護、長谷川澄代、岩井雅恵、堀元栄詞、滝澤剛則:富山県内の蚊と豚における日本脳炎ウイルス保有状況:平成18年度日本獣医師会、さいたま市、2007年2月

- 3) 小原真弓、渡辺護、長谷川澄代、岩井雅恵、堀元栄詞、滝澤剛則、倉田毅:富山県内の蚊と豚における日本脳炎ウイルス保有状況(2004年～2006年):第42回日本脳炎ウイルス生態学研究会、白山市、2007年5月

- 4) 山内健生、小原真弓、長谷川澄代、堀元栄詞、岩井雅恵、林美貴子、米田豊、安藤秀二、堀田和、城石将幸、出村尚子、松浦涼子、廣瀬修、渡辺護:富山県の平野部における感染症媒介蚊の生息調査(2003～2007年):第62回日本衛生動物学会西日本支部大会、大津市、2007年10月

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

I. 謝辞

本研究の実施には、下記の方々ならびに機関の協力を賜りました。ここに深く感謝いたします。

蚊の成虫調査にご協力くださったボランティアの方々、新潟検疫所富山空港出張所、富山市保健所、富山県各厚生センター、国立感染症研究所昆虫医科学部、国立感染症研究所ウイルス第一部第二室、国立感染症研究所獣医科学部今岡浩一先生、富山市環境部環境保全課、丸三製薬株式会社、富山県鳥獣保

護センター湯浅純孝先生、富山県厚生
部生活衛生課

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）
（総合）分担研究報告書

鳥類における WNV 検出および抗 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： WNV の日本への侵入や、国内での流行の拡大には、野鳥の果たす役割も大きいと考えられる。そこで、鳥における WNV や抗 WNV 抗体を検出する方法について JEV との鑑別を考慮しながら検討した。また、鳥類における抗体保有状況を検討した。

WNV および JEV 遺伝子の検出方法として、従来より用いられている PCR、TaqMan PCR に加えて、あらたにハイブリダイゼーションプローブを用いた LightCycler による Real-Time RT-PCR と特異的遺伝子検出のためのカスタムアレイを開発した。これらの方法では、JEV、WNV とともに、その Lineage や Genotype を判別する事を可能とした。非常に有効な検出法であると思われる。

鳥類における WNV および JEV に対する抗体検査法では、各々に特異的な Blocking-ELISA を確立した。この Blocking-ELISA と PRNT を用いて、鳥類における WNV および JEV に対する抗体保有状況を調査した結果、PRNT により陽性を示す物が、ろ紙による採取法を用いたサンプルからのみ認められた。しかし、いずれも Blocking-ELISA や Western-Blotting により特異性の検証を行った結果、サンプルの非特異的反応の可能性が否定できなかった。さらに採取法や検出の特異性の検証が必要であると思われる。

A. 研究目的

ウエストナイルウイルス (WNV) は、蚊と鳥の間で感染環が維持され、主に蚊を介してヒトに感染し急性熱性疾患や脳炎を引き起こす。アフリカ、東ヨーロッパ、西アジアなどで流行が報告されていたが、近年の米国における流行の拡大には野鳥の関与が考えられており、また、ロシアにおいても野鳥の WNV 感染が確認され、

その感染が西アジア方面からシベリア方面にまで広がってきている傾向が見られている。そこで、WNV の日本への侵入や拡大に備えるためには、その役割が大きいと考えられる鳥における WNV および WNV に対する抗体検出法を確立することが必要である。また、JEV との交差反応が考えられるため、その鑑別の可能な検出系を構築する必要がある。これらの検討により、WNV の国内侵入リスクの把握や、国内で

の拡大に関する予測をたてることが可能となると思われる。

本研究では、WNV および JEV 遺伝子検出法の確立、鳥類における WNV および JEV に対する抗体検出法の開発、鳥類における WNV および JEV に対する抗体の保有状況調査を行った。

B. 研究方法

1. 鳥類における WNV 遺伝子検出法の確立

1-1. ウイルス RNA の抽出と cDNA の作製：
WNV (Lineage 1: NY99-6922, Eg101, g2266; Lineage 2: FCG) および JEV (Genotype 3: JaGAR01, Beijing (JE/Beijing/1/1949); Genotype 1: kouchi (JEV/sw/kouchi/25)) 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 を抽出した。cDNA は抽出した RNA より、SuperScript III (Invitrogen) と Random Hexamer Primer を用いて作製した。

1-2. WNV および JEV 遺伝子検出のための Real-Time PCR および Real-Time RT-PCR： 文献をもとに WNV 検出のために、Poly Protein (WNV-PoPr: Lanciotti RS et al), Envelope (WNV-Env: 感染研マニュアル) に対する Primer を作製した。さらに、JEV には Envelope (JEV-Env: 感染研マニュアル) に対する Primer を、また、両者を検出するものとして、NS3 (WJ-NS3: 感染研マニュアル) に対する Primer を作製し、サンプルには cDNA を用いて PCR の条件検討を行った。

また、TaqMan Probe を用いた Real-time PCR として、WNV の、3'NC, Envelope (WNV-3NCRT, WNV-EnvRT: Lanciotti RS et al) に対する Primer と TaqMan Probe を作製した。サンプルに RNA を用いた Real-Time RT-PCR と cDNA を用いた Real-Time PCR を Applied Biosystems 7500

Real-Time PCR System を用いて比較検討した。

さらに、WNV および JEV の Lineage, Genotype 特異的なハイブリダイゼーションプローブと、LightCycler を用いた Real-Time PCR を構築した。WNV 検出には Envelope 領域 (WNV-env)、JEV 検出には Envelope 領域 (JEV-env) および Poly Protein 領域 (JEV-PolyPr) を標的とし、各々の増幅領域内にそれぞれ特異的なハイブリダイゼーションプローブを作製した。作製に当たっては、Table 1 に示した Genbank の遺伝子情報をもとに、WNV-env については No.1~4 と反応し、それ以外と反応しない配列を、JEV-env については No.7~10 と反応し、それ以外と反応しない配列を、JEV-PolyPr については No.7~12 と反応し、それ以外と反応しない配列を選んだ。それぞれの反応条件は同一となるように設定した。RNA を用いた Real-Time RT-PCR と cDNA を用いた Real-Time PCR を LightCycler を用いて比較検討した。

1-3. WNV 遺伝子検出のためのカスタムマイクロアレイの作製： 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 (Table 2) 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。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。

ウイルス RNA を RNA Fragmentation Reagents を用いて断片化処理した後、遠心沈渣を 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) を用いて精製した。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、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。

2. 鳥類における抗 WNV 抗体検出法の確立と抗体保有状況調査

2-1. 鳥類サンプル: 渡り鳥 (ミヤマガラス、シギ・チドリ、ヨシゴイ、ガン・カモ類) および、留鳥 (ハシボソガラス、ハト、スズメ、ナキアヒル、イソシギ、ニワトリ) の血清を入手し抗体検出に用いた (Table 5)。また、カモ類のサンプルについては、大日本猟友会の協力の下、血液採取用のろ紙に血液を染みこませ、これを 0.5% BSA-PBS で抽出する方法でも収集した。この場合の血清希釈はろ紙に十分血液が採取されていた場合、1:25 と換算される。

陽性対照には、まず、CDC より、WNV 感染前後のスズメ (House Sparrow) およびハト (Rock Dove) 血清 (ウイルス (-): 各1羽) の分与を受けた。さらに、不活化 WNV または JEV で、4~5ヶ月令のニワトリ (白色レグホン) を免疫し、陽性対照血清を作製した。

2-2. 中和抗体の測定 (PRNT): WNV は NY99-6922 株、JEV は JaGAR01 株を用いた。サンプルは 25 倍希釈より用い、ウイルス液 (200PFU/100ul) を等量混和し、37°C、1時間反応させた。その後、6well プレート上の Vero 細胞に 100ul/well ずつ加え、37°C、1時間培養後、セルロース添加培養液を重層し、4日間培養した。ホルマリン固定後、メチレンブルーで染色し、プラークを計数し、サンプル非添加対照のプラーク数に対するプラーク減少率を求めた。結果は、90% 減少 (PRNT₉₀) を示すサンプル希釈濃度で示した。

2-3. 特異抗体の測定 (indirect ELISA): 抗原としてホルマリン不活化 WNV または JEV を、96well マイクロプレートにコーティングし、ブロッキング後サンプルを反応させた。次に、二次抗体を反応させ、OPD+H₂O₂ を用いて発色を見た。二次抗体には、HRPO 標識抗トリ IgG-ヒツジ IgG (ハト、アヒル、スズメ、ニワトリ IgG で免疫。Bethyl)、HRPO 標識抗ニワトリ IgG-ヒツジ IgG (Southern Biotech)、HRPO 標識抗七面鳥 IgG-ヒツジ IgG (Southern Biotech)、HRPO 標識抗ハト IgG-ウサギ IgG (Nordic Immunol.)、HRPO 標識抗アヒル IgG-ウサギ IgG (Nordic Immunol.) を入手し、比較検討を行った。

2-4. 特異抗体の測定 (Blocking-ELISA): 抗原としてホルマリン不活化 WNV または JEV を、96well マイクロプレートにコーティングし、Immunoblock を用いてブロッキングした後、トリ血清サンプル (25 倍希釈) を反応させた。次に、抗 WNV モノクローナル抗体 (3.67G) もしくは抗 JEV モノクローナル抗体 (clone503) を反応させ、二次抗体として HRPO 標識抗マウス IgG-ヒツジ IgG を反応させた。その後、OPD+H₂O₂ を用いて発色させ、OD490 にて吸光度を測定した。トリ血清サンプルを添加しない、いわゆる対照 well に対する吸光度の減少により、トリ血清サンプル中の抗原特異的抗体の有無を判定した。

2-5. 鳥類における抗体保有状況調査: PRNT および Blocking-ELISA を用いて、WNV および JEV に対する抗体を測定した。PRNT で抗体の保有が示唆されたサンプルについては、Western-Blotting による確認を実施した。Western-Blotting の抗原には、WNV もしくは JEV を感染させた細胞を可溶化した上清を用いた。

C. 研究結果

1. 鳥類における WNV の検出

1-1. Real-Time PCR および Real-Time RT-PCR: Table 3にPCR、TaqMan PCR、TaqMan RT-PCR (Fig. 1a) と LC を用いた Real-Time PCR および Real-Time RT-PCR (Fig. 1b-d) による検出の特異性を示した。WNV-env に対するハイブリダイゼーションプローブは、WNV NY99-6922 および Eg101 (Lineage 1) を濃度依存性に検出し、FCG (Lineage 2) および JEV は検出しなかった (Fig. 1b)。しかしながら Lineage 1 である g2266 は PCR では検出可能であるが、その領域におけるシーケンスが異なるため LC では検出出来なかった。JEV-env に対するハイブリダイゼーションプローブは JEV JaGAR および Beijing (Genotype 3) を検出したが kouchi (Genotype 1) および WNV は検出しなかった (Fig. 1c)。JEV-PolyPr に対するハイブリダイゼーションプローブは JEV の Genotype 1&3 をそれぞれ濃度依存性に検出し、WNV は検出しなかった (Fig. 1d)。

いずれも検出感度は、TaqMan PCR および TaqMan RT-PCR とほぼ同様であり、それぞれ 1-10、0.1-1 PFU/reaction であった (Table 4, Fig. 1)。TaqMan、ハイブリダイゼーションプローブともに、cDNA をテンプレートに用いたとき (Two-step Real-Time PCR) よりも RNA を直接、テンプレートに用いた RT-PCR (One-step Real-Time RT-PCR) の方が 10 倍程度感度が良かった (Table 4)。

1-2. カスタムマイクロアレイを用いた WNV 遺伝子検出の特異性: 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 (Fig. 2 上)。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 (Fig. 2 上)。

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 (Fig. 2 下)。検出感度については 4 ng/ul で特異的反応を検出できたが、サンプル遺伝子の増幅を行っていないため、10 倍に希釈した 0.4 ng/ul 以下の濃度では特異的反応は認められなかった。

2. 鳥類における特異抗体の測定 (indirect ELISA と Blocking-ELISA): indirect ELISA に用いる抗血清は、HRPO 標識抗トリ IgG-ヒツジ IgG (Bethyl) が、調査したすべての鳥種に反応した。しかしながら、その反応の程度に鳥種による差が認められ、鳥種間での比較が困難なことから、Blocking-ELISA の方が適していると考えられた。

Blocking-ELISA では、抗原に WNV を用いたときは、スズメおよびハトの WNV 感染血清と WNV 免疫ニワトリ血清は特異的に mAb の結合抑制効果を示した (Fig. 3a)。一方、抗原に JEV を用いたときは、JEV 免疫ニワトリ血清は特異的に mAb の結合抑制効果を示した (Fig. 3b)。WNV 免疫血清も抑制を示したが、スズメおよびハトの WNV 感染血清では、全く交差反応を示さなかった (Fig. 3b)。

3. 鳥類サンプルにおける抗体保有状況

各鳥類サンプルにおける、WNV および JEV に対する抗体保有状況を検討した。中和抗体 (PRNT) ならびに特異抗体 (Blocking-ELISA) の結果を Table 5 に示した。WNV 感染トリ血清

は、PRNT、Blocking-ELISA いずれの測定においても WNV に対する抗体のみが検出された。免疫ニワトリ血清では、いずれの測定系でも免疫した抗原に対して強く抗体が検出されたが、もう一方の抗原にも交差反応が認められた。

留鳥のサンプルはすべて、いずれの測定系でもどちらの抗原に対しても特異的抗体は検出されなかった。

渡り鳥については、カモ類の一部（ろ紙に採取したサンプル）で PRNT、Blocking-ELISA で陽性を示すサンプルが認められた（Table 5, 6）。PRNT では、JEV に対して 26/325、WNV に対して 11/325 が陽性を示した。ただし、これらの WNV 陽性サンプルはすべて JEV 陽性サンプルであり、すなわち WNV のみ陽性のサンプルはなかった。さらに、これらのうち Blocking-ELISA でも陽性を示したのは、JEV に対してのみ、4/211 サンプルであった。Table 6 にこれらサンプルのプロファイルを示した。Fig. 4 には 2006 年度サンプルの Blocking-ELISA の結果を示したが、3 検体が明らかに抑制を示している。ただ、2006 年度の残りのサンプルは抑制を示さなかった。Blocking-ELISA では、WNV に対しては、すべてが陰性であった。Table 6 に示したように、これらサンプルについては Western-Blotting も実施したが、いずれも特異的なバンドは検出されなかった。

D. 考察

WNV の国内侵入ならびに侵入後の国内での拡大に対して、米国における近年の WNV 流行地域の拡大を考えると、鳥類の果たす役割は非常に大きいと思われる。そこで、鳥類の感染状況、抗体保有状況調査を実施することで、WNV の国内侵入リスクの把握や、国内での拡大に関する予測をたてることが可能となり、各々に対する対策を構築することが出来ると考えられる。そのためには、鳥類における WNV および JEV 遺伝子および抗原検出法を確立する必要

がある。

WNV および JEV 遺伝子の検出方法として、従来より用いられている PCR、TaqMan PCR に加えて、あらたにハイブリダイゼーションプローブを用いた LC による Real-Time RT-PCR を開発した。日本は JEV の常在地域であるため、JEV と WNV の鑑別が重要である。今回の LC による方法では、JEV、WNV とともに迅速かつ特異的に検出し、さらに、その Genotype や Lineage を判別する事を可能とした。非常に有効な検出法であると思われる。

また、さらに、鳥類の感染保持しうるウイルスおよび他のフラビウイルスの遺伝子をスポットした、カスタムマイクロアレイを作製した。JEV、WNV とともに Genotype や Lineage 特異的に検出した。今後、他のウイルスを用いた反応の特異性の検証や、遺伝子増幅系を用いた感度の向上を行う必要があるが、有用な方法であると思われる。

鳥類における WNV および JEV に対する抗体検査法として、各々に特異的な Blocking-ELISA を確立した。この Blocking-ELISA と PRNT を用いて、鳥類における WNV および JEV に対する抗体保有状況を調査した。その結果、ろ紙による採取法を用いたサンプルで、PRNT により JEV に対して陽性を示す物が認められ、WNV にも反応を示す物が見られた。いずれも Blocking-ELISA や Western-Blotting により特異性の検証を行った結果、サンプルの非特異的反応の可能性が否定できなかった。よく用いられる方法ではあるが、ろ紙による採取法の検証も必要である。また、JEV など他のフラビウイルスに対する抗体は WNV と交差反応を示すことが知られている。そこで、鳥類における抗体保有状況の調査、特に国内留鳥における JEV に対する抗体保有状況の現状調査も必要であると思われる。

E. 結論

WNV および JEV 遺伝子の検出方法として、従来より用いられている PCR、TaqMan PCR に加えて、あらたにハイブリダイゼーションプローブを用いた LightCycler による Real-Time RT-PCR と特異的遺伝子検出のためのカスタムアレイを開発した。これらの方法では、JEV、WNV とともに、その Lineage や Genotype を判別する事を可能とした。非常に有効な検出法であると思われる。鳥類における WNV および JEV に対する抗体検査法では、各々に特異的な Blocking-ELISA を確立した。この Blocking-ELISA と PRNT を用いて、鳥類における WNV および JEV に対する抗体保有状況を調査した結果、PRNT により陽性を示す物が認められた。しかし、いずれも Blocking-ELISA や Western-Blotting により特異性の検証を行っ

た結果、サンプルの非特異的反応の可能性が否定できなかった。さらに採取法や検出の特異性の検証が必要であると思われる。

F. 健康危害情報

なし

G. 研究発表等

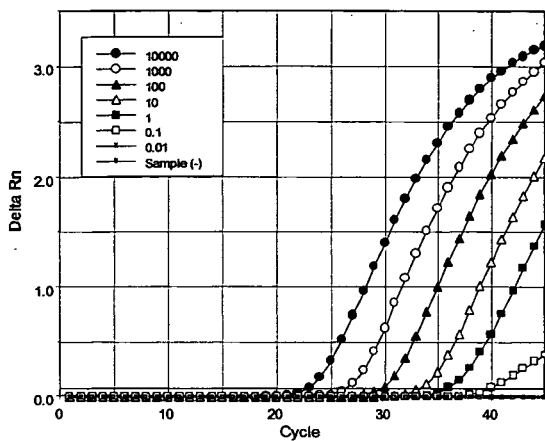
なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

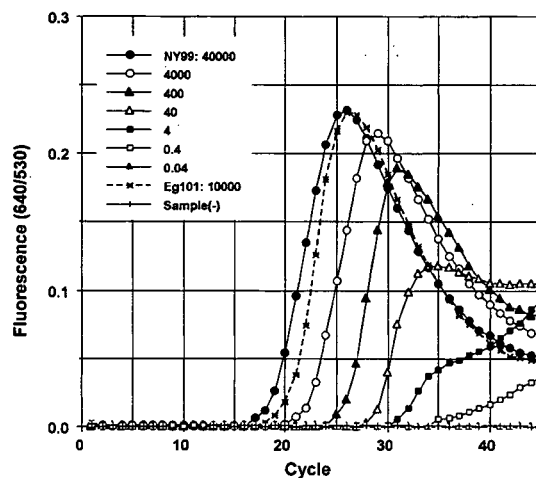
なし

Fig. 1) Real-Time RT-PCR による WNV/JEV の検出

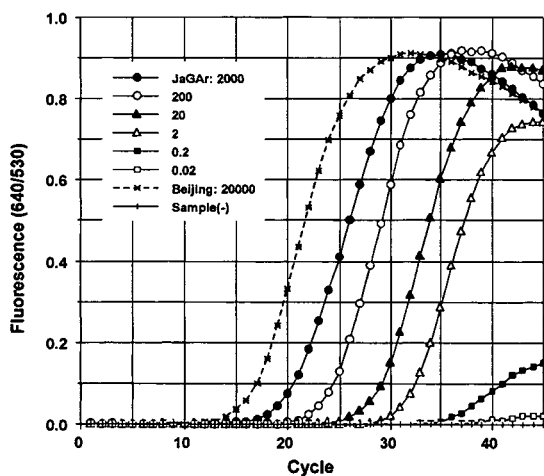
a) WNV (env) – TaqMan Probe (NY99)



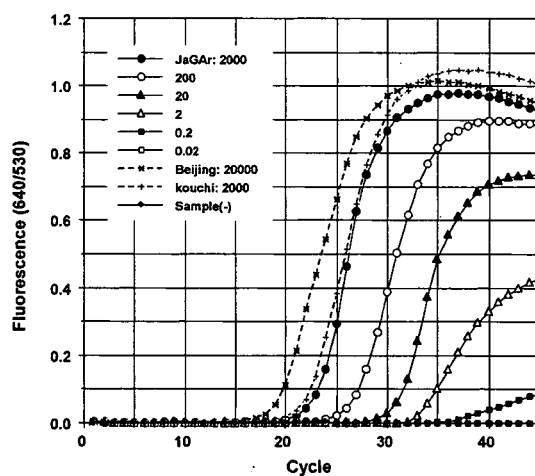
b) WNV (env) – Hybridization Probe



c) JEV (env) – Hybridization Probe



d) JEV (poly protein) – Hybridization Probe



グラフ中の数字は PFU/reaction

Fig. 2) カスタムアレイの解析結果

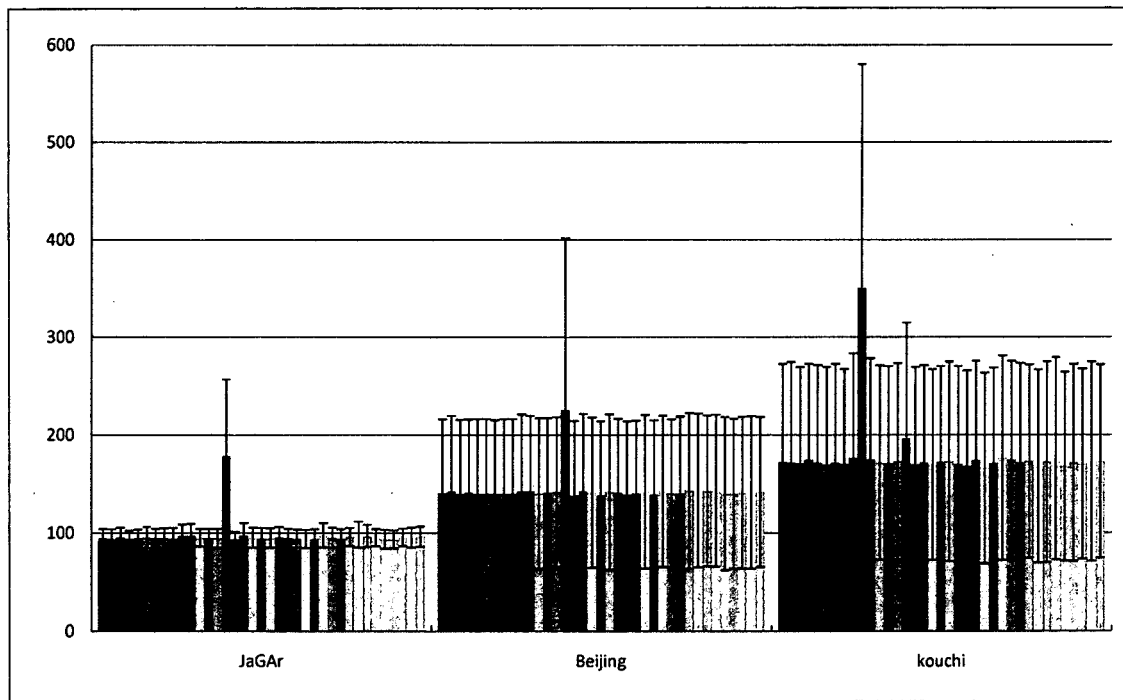
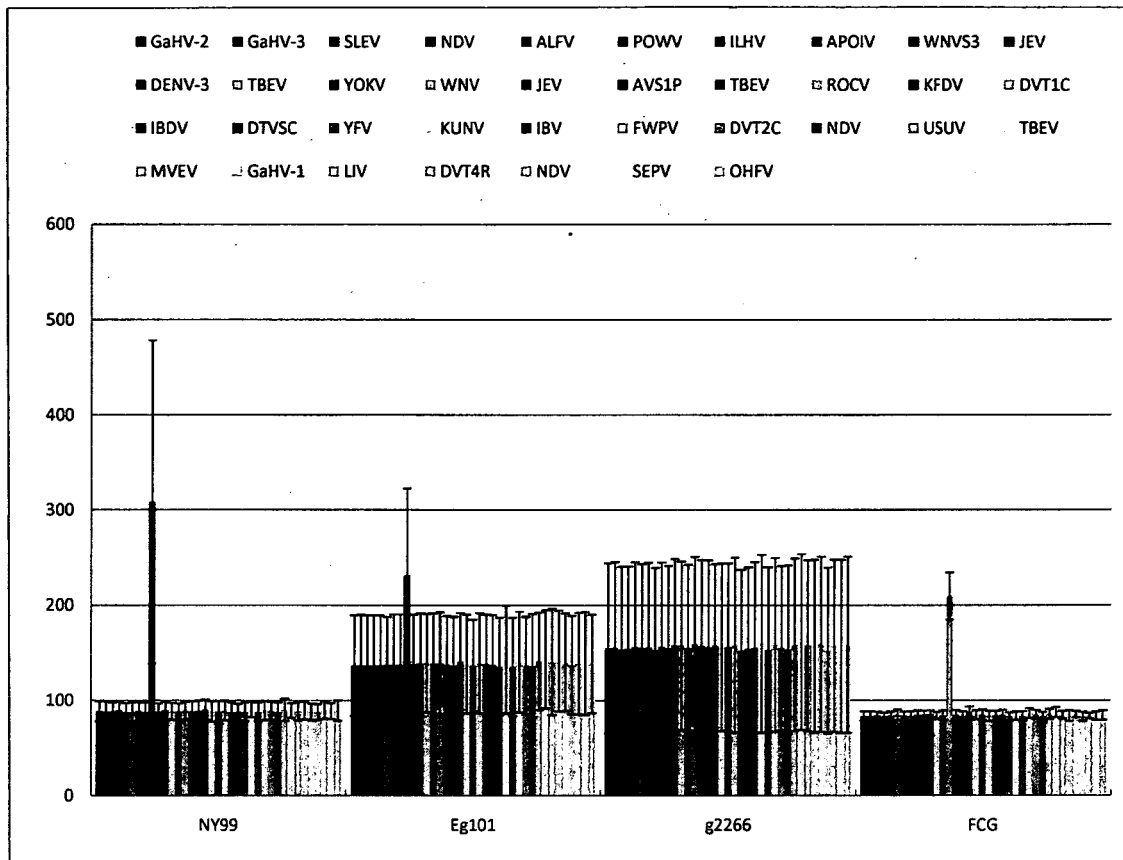
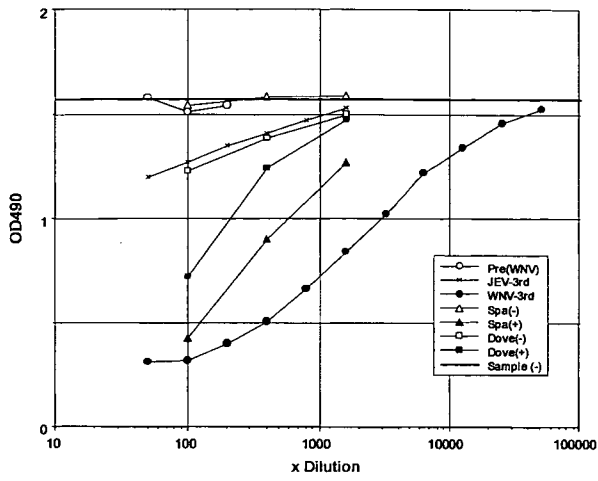


Fig. 3) Blocking-ELISA による各種トリ血清の mAb 結合抑制効果

a) Ag: WNV



b) Ag: JEV

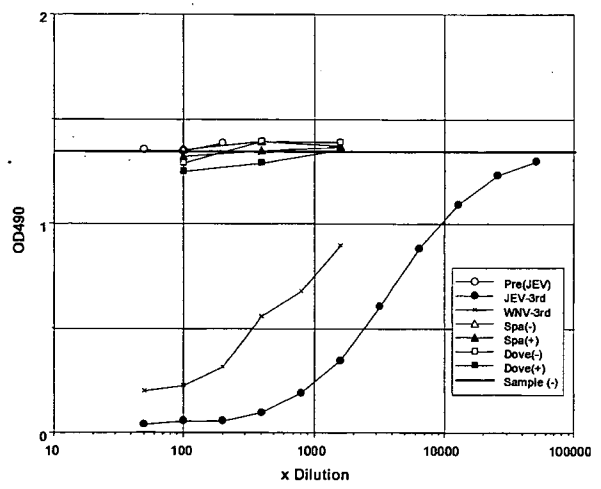


Fig. 4) Blocking-ELISA によるカモ血清 (2006 年度) の抗 JEV-mAb 結合抑制効果

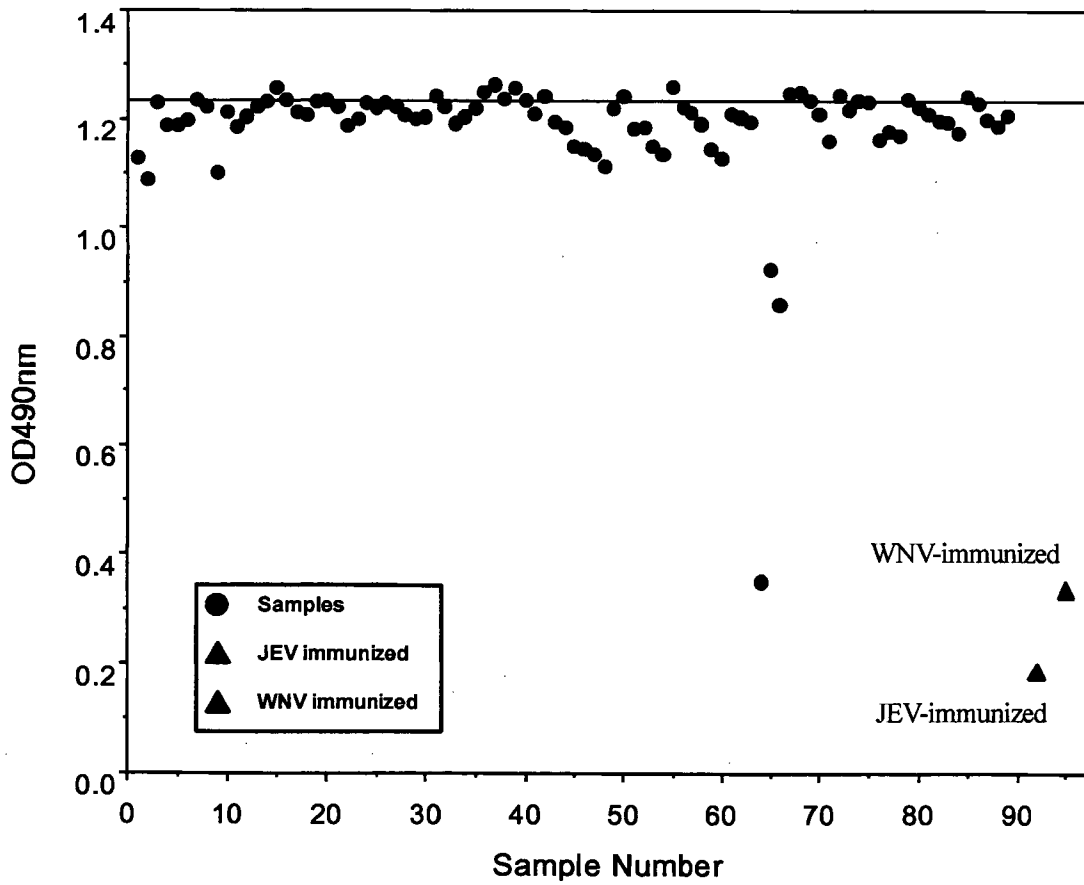
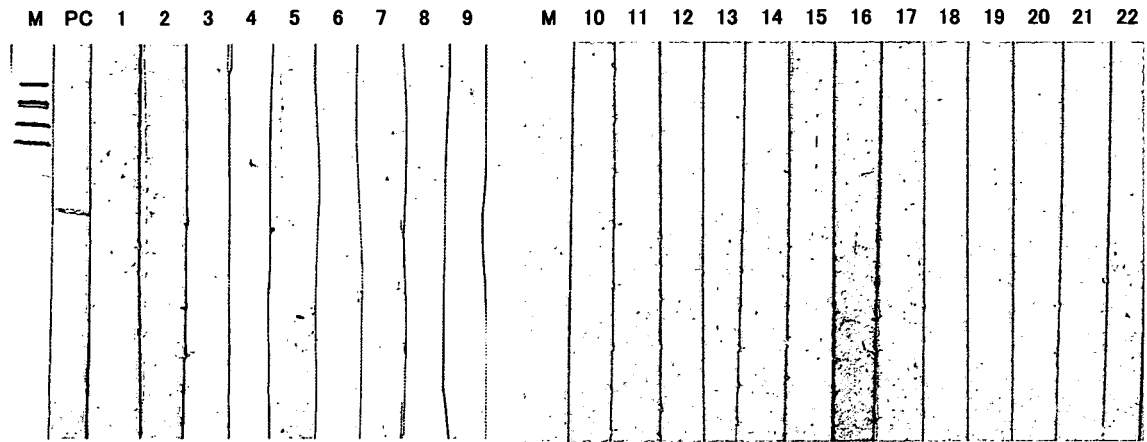


Fig. 5) ウェスタン・ブロッティングによる抗 JEV 抗体の検出



M: Size marker
PC: JEV immunized chicken sera
1-20: Anti-JEV Posi. Samples (by PRNT)
21, 22: Nega. Samples

Table 1) プローブのデザインに参考にしたウイルス

No.	Strain	Genbank Accession
1	WNV	385-99 AY842931
2		Eg101 AF260968
3		Italy1998 AF404757
4		RO97-50 AF260969
5		FCG M12294
7	JEV	JaOH0566 AY508813
8		JaGAR01 AF069076
9		JaTH160 AF269326
10		Beijing L48961
11		Ishikawa AB051292
12		Nakayama U21057
13	YFV	NC002031
14	SLEV	AF205509
15	MVEV	AF161266
16	Dengue Virus	1 NC001477
17		2 NC001474
18		3 NC001475
19		4 NC002640
20	Newcastle disease virus	NC002617
21	Marek's disease virus	NC002229
22	Fowlpox virus	NC002188

Table 2) 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	Alfuy 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
AY582986	Newcastle disease virus isolate anhinga/U.S.(FI)/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	LJV	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_005082	Omsk hemorrhagic fever virus, complete genome	OHFV	278

Table 3) PCR, Real-Time PCR による WNV/JEV 検出の特異性

			PCR				Real-Time PCR / Real-Time RT-PCR				
							TaqMan Probe		Hybridization Probe		
			WNV		JEV	Fla	WNV		WNV	JEV	
			env	PolyPr	env	NS3	env	3'NC	env	env	PolyPr
W N V	Lineage1	NY99-6922	+	+	-	+	+	+	-	-	
		Eg101	+	+	-	+	+-	+	+	-	-
		g2266	+	-	-	+	-	-	-	-	-
	Lineage2	FCG	-	+	-	+	-	-	-	-	-
J E V	Genotype3	JaGAR	-	-	+	+	-	-	-	+	+
		Beijing	-	-	+	+	-	-	-	+	+
	Genotype1	kouchi	-	-	+	+	-	-	-	-	+

Table 4) PCR, Real-Time PCR, Real-Time RT-PCR による WNV/JEV 検出感度 (PFU/reaction)

Assay		Tatget		WNV	JEV
PCR (cDNA)		WNV	env	10	-
			PolyPr	1-10	-
		JEV	env	-	1
			NS3	100	100
Real-Time PCR (cDNA)	TaqMan Probe (ABI7500)	WNV	env	1	-
			3'NC	1-10	-
	Hybridization Probe (LC)	WNV	env	1-10	-
			JEV	env	-
		PolyPr		-	1
Real-Time RT-PCR (RNA)	TaqMan Probe (ABI7500)	WNV	env	0.1	-
			3'NC	0.1-1	-
	Hybridization Probe (LC)	WNV	env	0.1-1	-
			JEV	env	-
		PolyPr		-	0.1-1

Table 5) PRNT および Blocking-ELISA による鳥類サンプルの抗体測定

				検体数	PRNT90		Blocking-ELISA	
					JEV	WNV	JEV	WNV
WNV 感染鳥 (CDC)	イエズメ (-)			1	<25	<25	-	-
	イエズメ (+)			1	<25	300	-	+
	カワラバト (-)			1	<25	<25	-	+-
	カワラバト (+)			1	<25	75	-	+
WNV/JEV 免疫ニワトリ	JEV-1			1	400	<25	++	+
	JEV-2			1	400	<25	++	+
	WNV-1			1	100	400	+	++
	WNV-2			1	200	400	+	++
留鳥	ハシボソガラス	埼玉	2005.7	1	<25	<25	-	-
	ハシボソガラス	堺	2005.7	2	<25	<25	-	-
	ハト	東京	2005.7	5	<25	<25	-	-
	ズメ	東京	2005.7	3	<25	<25	-	-
	ナキアヒル(合鴨)	東京	2005.7	4	<25	<25	-	-
	イソシギ	宮城	2005.9	3	<25	<25	-	-
	ニワトリ	(実験用)	2005	11	<25	<25	-	-
渡り鳥	シギ・チドリ	千葉	2005.9	33	<25	<25	-	-
	ミヤマガラス	秋田	2006.2	12	<25	<25	-	-
	シギ類	宮城	2006.9	10	<25	<25	-	-
	ヨシゴイ(サギ科)	宮城	2006.9	3	<25	<25	-	-
	コガモ	宮城	2006.9	2	<25	<25	-	-
	オナガガモ	新潟	2006.10	10	<25	<25	-	-
	マガモ	帯広	2006.11	14	<25	<25	-	-
	オナガガモ	帯広	2006.11	6	<25	<25	-	-
	マガモ	宮崎	2006.11	6	<25	<25	-	-
	マガン	島根	2007.2	10	<25	<25	-	-
	マガモ	帯広	2007.11	5	<25	<25	-	-
	オナガガモ	帯広	2007.11	8	<25	<25	-	-
	ミヤマガラス	秋田	2008.2	26	<25	<25	-	-
	オナガガモ	栗石	2008.2	44	<25	<25	-	-
	カモ類	(猟友会)	2004年度	29	1/29	1/29	-	-
	カモ類	(猟友会)	2005年度	122	12/122	6/122	1/122	-
カモ類	(猟友会)	2006年度	89	10/89	4/89	3/89	-	
カモ類	(猟友会)	2007年度	85	3/85	0/85	-	-	

Table 6) JEV に対する PRNT 陽性鳥類サンプルの解析

年度	地域	種類	採取日	PRNT		Blocking ELISA		Western Blotting	
				JEV	WNV	JEV	WNV	JEV	WNV
2005	北海道	マガモ	10/01	+	-	-	-	NT	NT
	北海道	オナガガモ	10/01	+	-	-	-	NT	NT
	北海道	コガモ	10/02	+	+	-	-	NT	NT
	北海道	コガモ	10/02	+	+	-	-	NT	NT
	福井	マガモ	01/07	+	+	-	-	NT	NT
	島根	マガモ	12/04	+	-	-	-	-	NT
	長崎	マガモ	12/05	+	+	+	-	-	-
	長崎	マガモ	12/04	+	-	-	-	-	NT
	熊本	オナガガモ	12/12	+	+	-	-	-	-
	大分	ヒドリガモ	12/22	+	+	-	-	-	-
2006	大分	マガモ	01/19	+	-	-	-	-	NT
	大分	コガモ	01/30	+	-	-	-	-	NT
	北海道	コガモ	10/01	+	-	-	-	-	NT
	島根	マガモ	12/10	+	-	-	-	-	NT
	山口	マガモ	12/17	+	-	-	-	-	NT
	山口	ヒドリガモ	12/17	+	-	-	-	-	NT
	福岡	ヒドリガモ	12/04	+	+	-	-	-	-
	長崎	マガモ	12/04	+	-	-	-	-	NT
	長崎	オナガガモ	12/08	+	+	-	-	-	-
	熊本	マガモ	12/06	+	+	+	-	-	-
2007	熊本	マガモ	12/06	+	-	+	-	-	-
	熊本	マガモ	12/06	+	+	+	-	-	-
	石川	マガモ	11/30	+	-	-	-	-	NT
	石川	マガモ	11/30	+	-	-	-	-	NT
	鹿児島	コガモ	12/07	+	-	-	-	-	NT

厚生労働省・新興再興感染症研究事業
分担総合研究報告書

ヒト用ウエストナイル熱ワクチン開発に関する研究

(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人や馬での感染では急性熱性感染症を引きおこし、時には中枢神経系に侵入し髄膜炎・脳炎を発症することが知られている。日本でもウエストナイルウイルスが侵入し定着した場合、多くの動物での発生ならびにヒトにおいても多くの脳炎患者が発生することが危惧される。したがって、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 17 年度はヒト用ホルマリン不活化ワクチンを Vero 細胞を用いた組織培養法で作製し、ワクチン効力試験をマウスにて実施し、その 100% 感染防御効果を確認した。家畜用リコンビナント生ワクチン開発には、Fusion-PCR 法によりウエストナイルウイルス NY 9 9 株の E 蛋白遺伝子を弱毒日本脳炎生ワクチン株 (ML 17 株) に挿入したキメラウイルスを作出し、ウエストナイルウイルス NY 9 9 株と比較して大幅に病原性、神経侵襲性、神経毒性が低下しており、弱毒株であることを確認した。次いで、ワクチン効力試験をマウスにて実施し、100% 感染防御効果を確認した。

平成 18 年度はヒト用ホルマリン不活化ワクチンについては GLP 試験を実施し、安全であることを確認した。家畜用リコンビナント生ワクチンについてはマウス脳内接種による神経毒性試験を実施したところ若干の病原性が認められたため、キメラの cDNA 中に認められた遺伝子変異を修復した。また、ウエストナイルウイルスに対する単クローン抗体を作出した。

平成 19 年度はヒト用ホルマリン不活化ワクチンについては 100% 感染防御効果を示すための最少有効投与量および必要 IgG 抗体価を検討した。さらには追加の GLP 試験を実施し、安全であることを確認した。

A. 研究目的

ウエストナイルウイルスはアフリカ、中近東、西アジアなどの旧大陸に広く分布する蚊媒介性ウイルスでありフラビウイルス科に属する。人や馬での感染では急性熱性感染症を引きおこし、時には中枢神経系に侵入し髄膜炎・脳炎を発症することが知られている。ウエストナイルウイルスは 1999 年に米国に侵入し、2003

年には米国全土のみならずカナダやメキシコにも波及している。2005 年には米国だけで 2799 名 (102 名死亡) の患者数を記録し、重大な社会問題となっている。この米国に侵入した株は従来旧大陸で流行していた株と比較してウイルス増幅動物である鳥での病原性が強く、人に感染した場合の髄膜炎・脳炎発症率が高いことなど極めて強毒な株である。日本でも

2005年夏に初の患者（米国からの輸入例）が報告され、ウエストナイルウイルスが定着した場合、多くの患者が発生することが危惧される。したがって、本研究ではヒト用不活化ワクチンと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 17 年度」

B. 研究方法

[1] ヒト用ウイルス不活化ワクチン

1) 不活化ワクチンの作成

ウエストナイルウイルス（NY99 株）をホルマリンにて不活化した。

2) ワクチン効力検定

C57B/6N マウスを用い試作ワクチンを一週間間隔で 2 回腹腔内投与し、2 回目の投与から 14 日後に致死量の攻撃ウイルス（100MLD₅₀）を腹腔内投与し、16 日間症状の出現と死亡の有無を観察、記録した。

[2] 遺伝子組換えキメラウイルス生ワクチン

1) キメラウイルスの作出

ウエストナイルウイルス（NY99 株）のエンベロープ領域遺伝子を PCR により増幅し、エンベロープ領域以外の構造タンパク領域（C、prM）+ 5' 非翻訳領域のフラグメント並びに非構造タンパク領域（NS1、NS2a、NS2b、NS3、NS4a、NS4b、NS5）+ 3' 非翻訳領域のフラグメントは日本脳炎ウイルス（ML-17 株）を鋳型として 2 つあるいは 3 つのフラグメントを同時に鋳型として PCR を行い一本の DNA にする FusionPCR を行い、最終的に全長 DNA を作出した。

In Vitro Transcription 法により RNA を作り、Electroporation 法により C6/36 細胞内に遺伝子導入してその細胞を培養する事により子孫ウイルス（ウエストナイルウイルスと日本脳炎ウイルスのキメラウイルス）を回収した。ブランク法によりクローン純化を行ない、その内 2 クローン（3-1 株および 3-2 株）をそれ以

後の試験に用いた。

2) ワクチン効力検定

C57B/6N マウスを用い 2 クローンのキメラウイルスを各種濃度（10⁷、10⁶、10⁵、10⁴、10³、10²、10、1FFU/マウス）用意して一回腹腔内投与し、14 日後に致死量の攻撃ウイルス（100MLD₅₀）を腹腔内投与し、16 日間症状の出現と死亡の有無を観察、記録した。

3) 神経侵襲性試験

C57B/6N マウスを用い 2 クローンのキメラウイルスを各種濃度（10⁷、10⁶、10⁵、10⁴、10³、10²、10、1FFU/マウス）用意して一回腹腔内投与し、16 日間症状の出現と死亡の有無を観察、記録した。

4) 神経毒性試験

C57B/6N マウスを用い 2 クローンのキメラウイルスを各種濃度（10⁷、10⁶、10⁵、10⁴、10³、10²、10、1FFU/マウス）用意して一回脳内投与し、16 日間症状の出現と死亡の有無を観察、記録した。

C. 結果

[1] ヒト用ウイルス不活化ワクチン

西ナイルウイルス NY 株を大量培養した Vero 細胞に感染させ低濃度のホルマリンにより不活化する方法で不活化ワクチンを 2 ロット作製し動物実験によりその有効性を確認した。ヒトでの臨床試験を目指してさらに大きな規模でのワクチンロットを作製し、GLP 試験を終了し良好な結果を得た。これにより現在ヒトでの 1 相試験を開始する準備を行っている。

[2] 動物用キメラウイルス生ワクチン

弱毒日本脳炎生ワクチン株（ML17 株）とウエストナイルウイルス NY99 株とのキメラウイルスを作製した。Fusion-PCR 法によりウエストナイルウイルス NY99 株の E 蛋白遺伝子を ML17 株に挿入したキメラウイルスの作製に成功した。

このキメラウイルスの動物（マウス）での病原性（腹腔内接種および脳内接種による MLD₅₀）、

神経侵襲性試験、神経毒性の定量的解析を実施したところ、ウエストナイルウイルス NY 株と比較して大幅に病原性、神経侵襲性、神経毒性が低下していることが認められ、弱毒株であることを確認した。

次いで、ワクチン効力試験をマウス 90 匹にて実施したところ $10^5 \sim 10^7$ FFU/匹のキメラウイルスをあらかじめ接種したマウス群においてウエストナイルウイルス NY 99 株 (100MLD₅₀) の攻撃に対し 100% 感染防御効果を示した。

E. 考察

不活化ワクチンについては 2005 年日本においてもウエストナイル熱患者 (海外感染例) が報告された状況から一刻も早い実用化のためヒトでの臨床試験を実施する必要がある。

キメラウイルスの生ワクチンについては若干の神経毒性が認められたので、今後その原因を探り、より安全性の高いキメラウイルスに改良する必要がある。さらに接種動物でのウイルス血症の有無、蚊への感染性の有無などより詳細な検討が必要である。

結論

(1) 我々が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有効性がマウスを用いた実験で確認された。動物での安全性試験 (局所刺激試験、催奇形性試験、毒性試験など) でも十分な安全性が確認された。

(2) 生ワクチンの開発については当教室の作出した日本脳炎ウイルスワクチン株とウエストナイルウイルスのキメラウイルスを用いて、マウスに対するキメラウイルスの神経毒性、神経侵襲性実験による弱毒化の確認およびワクチン効力試験による感染防御効果が実証された。

「平成 18 年度」

B. 研究方法

[1] ヒト用ウイルス不活化ワクチン

2) 不活化ワクチンの作製

マイクロキャリアー上に培養した Vero 細胞にウエストナイルウイルス株 (NY 株) を感染させ培養上清中のウイルス粒子を超遠心法により濃縮精製したのちホルマリンにより不活化しホルマリンを除去して作製した。

3) GLP 試験を下記の項目について実施した。

1. ラットにおける単回皮下投与毒性試験
2. イヌにおける単回皮下投与毒性試験
3. 筋肉内局所刺激性試験
4. 4 週間反復皮下投与毒性試験
5. 一般薬理試験
6. 遺伝毒性試験
細菌を用いた復帰突然変異試験

[2] 遺伝子組換えキメラウイルス生ワクチン

1) 完全長 cDNA クローンの構築

日本脳炎ウイルス生ワクチン株 (ML17) の遺伝子 RNA を鋳型として RT-PCR 法により (図 1) のように 4 個の cDNA 断片を pCR-XL に挿入してクローニングし、同時にウエストナイルウイルス NY 株から E タンパク遺伝子を同じく pCR-XL にクローニングしてそれぞれを試験管内でつなぎ合わせ、キメラウイルス cDNA を pMW119 にクローニングした。このプラスミドに組み込まれた完全長 cDNA の全塩基配列を決定し、突然変異のあった箇所は修復した。

C. 結果

[1] ヒト用ウイルス不活化ワクチン

a) ラットにおける単回皮下投与試験

ウエストナイル熱ワクチンのヒトでの臨床投与量を 0.05 mL/kg と予定していることから、その 10 倍量である 0.5 mL/kg (低用量)、100 倍である 5 mL/kg (高用量)、対照群として生理食塩液 5 mL/kg の計 3 群を設定し、1 群雌

雄各 5 匹に皮下投与し、その生死、体重の増加、局所の病理変異を検証した。その結果、雌雄とも観察期間を通じて死亡例はなく、一般状態にも投与による影響は認められなかった。体重の推移については雌雄とも観察期間を通じて 0.5 及び 5 mL/kg 群とも対照群との間に有意な体重変動はなく、投与による影響は認められなかった。剖検では、全例に被験物質投与による変化は認められなかった。

b) イヌにおける単回皮下投与毒性試験

7 か月齢のビーグルを用いて、ウエストナイル熱ワクチンの臨床投与量の 10 及び 100 倍量である 0.5 及び 5 mL/kg 並びに対照として日本薬局方生理食塩液 5 mL/kg の計 3 群を設定し、1 群雄各 2 頭に単回皮下投与した。一般状態、体重推移及び剖検において、被験物質投与による影響は認められなかった。

c) 筋肉内局所刺激性試験

15 週齢の Kbl: JW, SPF ウサギ雄 18 匹を用いて左右又は右の外側広筋に、ウエストナイル熱ワクチン、対照物質（安定剤）、陽性対照物質（1.7 及び 0.425 w/v% 酢酸溶液）又は陰性対照物質（日本薬局方生理食塩液）を 0.5 mL/site ずつ 6 匹に単回投与した。投与後 2 日及び 7 日に各 3 匹、計 9 匹を剖検して投与部位（n=3）を摘出し、病理学的検査を行った。ウエストナイル熱ワクチンでは、肉眼所見で投与後 2 日及び 7 日も変化は認められなかった。病理組織学的所見では、投与後 2 日にごく軽度の偽好酸球や単核細胞からなる炎症性細胞浸潤及び筋線維の変性・壊死、投与後 7 日にごく軽度の筋線維の再生が認められた。

ウエストナイル熱ワクチンの成分である安定剤及び生理食塩液では、西ナイル熱ワクチンと同等の局所障害性が認められた。一方、陽性対照物質である 0.425 及び 1.7 w/v% 酢酸溶液では用量に関連して、肉眼所見で投与後 2 日に灰白色化、投与後 7 日に淡褐色～褐色化、病理組織学的所見で投与後 2 日に筋線維の変性・壊死、投与後 7 日に炎症性細胞浸潤、筋線維の再

生、肉芽組織等を主体とした局所刺激性が認められた。

d) 4 週間反復皮下投与試験

6 週齢の Crj:CD (SD) IGS, SPF ラットをにいて、ウエストナイル熱ワクチンの臨床投与量の 10 倍量である 0.5 mL/kg 並びに対照として日本薬局方生理食塩液 0.5 mL/kg の計 2 群を設定し、1 群雌雄各 10 匹に 1 日 1 回、1 週間隔で 4 回投与した。その間、一般状態の観察、体重・摂餌量の測定、尿検査及び眼科学的検査を行い、最終投与後 1 週間に採血して血液学的検査及び血液生化学的検査を行い、安楽死させ剖検して病理学的検査を行った。その結果、一般状態、体重推移、摂餌量及び諸検査において、ウエストナイル熱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 倍量である 0.5 mL/kg の 1 日 1 回、1 週間間隔での 4 回投与では明らかな全身性の毒性はないものと判断された。

e) 一般薬理試験

(ラットにおける呼吸機能に及ぼす影響)

6 週齢の雄性 SD 系ラット、1 群 8 例に、臨床投与量の 10 倍量である 0.5 mL/kg 及び対照として日本薬局方生理食塩液 0.5 mL/kg をそれぞれ単回皮下投与した。投与前、投与後 15 分、1、2、4 及び 6 時間にラットの呼吸機能（1 回換気量、呼吸数及び分時換気量）を測定した。

ウエストナイル熱ワクチンの 0.5 mL/kg 群では、いずれの測定時点においても 1 回換気量、呼吸数及び分時換気量に変化は認められず呼吸に及ぼす影響はないと判断された。

(ラットにおける腎機能に及ぼす影響)

6 週齢の Crj:CD (SD) IGS, SPF ラットに、ウエストナイル熱ワクチンの臨床投与量の 10 倍量である 0.5 mL/kg を単回皮下投与し、投与後 6 時間までの尿量及び尿中電解質を測定した。対照として、日本薬局方生理食塩液 0.5 mL/kg を単回皮下投与した。その結果、投与後の尿量及び尿中電解質に、ウエストナイル熱