

ワクチンの投与による影響は認められなかった。

D) 遺伝毒性試験

(細菌を用いた復帰突然変異試験)

ウエストナイル熱ワクチン本剤と溶剤を混合した調製原液を被験物質とし、ネズミチフス菌 (*Salmonella typhimurium*) TA98 株, TA1537 株, TA100 株, TA1535 株及び大腸菌 (*Escherichia coli*) WP2uvrA 株の計 5 菌株を用いて、プレインキュベーション法により復帰突然変異試験を行った。

調製原液 500 μ L/plate を最高用量に、以下、200, 100, 50 及び 20 μ L/plate の計 5 用量で S9mix を添加した場合 (代謝活性化法, + S9mix) と添加しない場合 (直接法, -S9mix) について用量設定試験及び本試験を行った。それぞれ、陰性対照には生理食塩液 100 μ L/plate を、陽性対照には陽性対照物質溶液 100 μ L/plate を添加した。

その結果、用量設定試験及び本試験ともに、いずれの用量においても陰性対照値の 2 倍を超える復帰変異コロニー数は認められなかった。また、生育阻害も認められなかった。

当試験では各菌株の陰性対照値及び陽性対照値は試験評価にとって妥当な反応であったことから、本試験は成立したと考えられウエストナイルワクチンの変異原性は検出できなかった。

[2] 動物用キメラウイルス生ワクチン

日本脳炎ウイルス弱毒生ワクチン株 (ML17) にウエストナイルウイルス NY 株の E タンパク遺伝子を組み替えたキメラウイルスの cDNA を大腸菌プラスミドに組み込んだ。このプラスミドの塩基配列を決定したところ複数の遺伝子変異が発生しており、Site specific mutagenesis 法により 1 つづつ元の塩基配列への修復作業を実施した。

D. 考察

不活化ワクチンについては現在ヒト臨床試験用ロットを作製しており今後、追加 GLP 試験を実施したあとに、平成 19 年度中にヒトでの臨床試験を実施する必要がある。

生ワクチンについてはキメラウイルスの cDNA がクローニングできたことから、今後遺伝子操作を行いさらに完全弱毒化への作業が可能となった。

E. 結論

(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 GLP 試験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臨床等用量の 10 倍量投与したラット、イヌでの単回投与およびラットでの 1 週間間隔での 4 回投与の場合においても一般状態、体重推移、摂餌量及び諸検査において、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。

またラットにおいて臨床投与量の 10 倍量を投与した場合においても呼吸、腎機能に及ぼす影響はなく一般薬理的な毒性はないものと判断された。

遺伝毒性試験においては西ナイル熱ワクチンにはネズミチフス菌及び大腸菌の計 5 菌株において変異原性は認められないと結論した。

(2) 日本脳炎ウイルス ML17 株とウエストナイルウイルス NY 株のキメラウイルス cDNA を大腸菌プラスミドを用いてクローニングした。

「平成 19 年度」

E. 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。

1. 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。

2. 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。

3. 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、胸部運動、採血して血液ガス (pO₂, pCO₂, pH、ヘモグロビン O₂) の測定である。

4. 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)。

D. 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では 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 μ g/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では 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。

(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週間における 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。

【2】動物の安全性薬理試験

1. 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。

2. 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、対照群に比較して 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。

3. 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。

4. 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。

F. 研究発表

「平成 17 年度」

1) 論文発表

Paresh Sumatilal Shah, Mariko Tanaka, Afjal Hossain Khana, Edward Gitau Matumbi Mathenge, Isao Fuke, Mitsuo Takagi, Akira Igarashi, Kouichi Morita. Molecular characterization of attenuated Japanese encephalitis live vaccine strain ML-17. *Vaccine* Vol.24 402- 411, 2006.

Wei-Feng Tang, Yuki Eshita, Masayuki Tadano, Kouichi Morita and Yoshihiro Makino. Molecular basis for adaptation of a chimeric dengue type4/Japanese encephalitis virus to vero cells. *Microbiol. Immunol.*, Vol. 49:285-294, 2005.

Manmohan Parida, Kouhei Horioko, Hiroyuki Ishida, Paban Kumar Dash, Parag Saxena, Asha Mukul Jana, Mohammed Alimul Islam, Shingo Inoue, Norimitsu Hosaka, and Kouichi Morita. Rapid Detection and Differentiation of Dengue Virus Serotypes by a Real-Time Reverse Transcription-Loop-Mediated Isothermal

Amplification Assay. *J. Clin. Microbiol.* Vol.43: 2895-2903, 2005.

Celia C. Carlos, Kazumori Oishi,* Maria T. D. D. Cinco, Cynthia A. Mapua, Shingo Inoue, Deu John M. Cruz, Mary Ann M. Pancho, Carol Z. Tanig, Ronald R. Matias, Kouichi Morita, Filipinas F. Natividad, Akira Igarashi, And Tsuyoshi Nagatake. 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, 435- 440,2005.

Fuxun Yu, Mai Quynh Le, Shingo Inoue, Hong Thi Cam Thai, Futoshi Hasebe, Maria del Carmen Parquet, Kouichi Morita. Evaluation of Inapparent Nosocomial Server Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Infection in Vietnam by use of Highly Specific Recombinant Truncated Nucleocapsid Protein-Based Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology.* Vol.12, 848-854, 2005.

Leonora T.D. Salda, Maria D.C.Parquet, Ronald R. Matias, Filipinas F. Natividad, Nobuyuki Kobayashi, Kouichi Morita. Molecular Epidemiology of dengue 2 viruses in the Philippines: Genotype shift and local evolution. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* Vol. 73, 796-802, 2005

Nawa M., Takasaki T., Ito M., Inoue S., Morita K., and Kurane I. Immunoglobulin A Antibody Responses in Dengue Patients: a Useful Marker for Sero diagnosis of Dengue Virus Infection. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology.* Vol.12, 1235-1237, 2005.

森田公一：「デング熱、デング出血熱」、今日の

治療指針 2005, p143, 2005.

森田公一：「国際感染症、日本脳炎」、臨床看護、Vol. 31, 169-172, 2005.

森田公一：「西ナイル熱・脳炎 - 最近の動向」、長崎市医師会報、Vol. 39, 14-16, 2005

森田公一：「バイオセーフティー」 in 標準微生物学 (第9版)、山西弘一 監修、医学書院、2005

森田公一：「ウエストナイル熱に対するワクチン」臨床とウイルス、Vol. 33, 28-32. 2005

森田公一：「ウエストナイル熱」モダン フィジシャン、Vol. 25, 523-526. 2005.

森田公一：「ウエストナイル熱とワクチン開発の現状」感染症、Vol. 35, 91-96. 2005.

森田公一：「フラビウイルスによる疾患 (ウエストナイル熱、デング熱を中心に)」カレントセラピー、Vol. 27, 722-724, 2005.

森田公一：「ウエストナイル脳炎」、*Infectious Disease Report* 2005, No28, 2005.

森田公一：「ウエストナイルウイルス」、*Drug Delivery System.* Vol.20(5). 556-557, 2005.

森田公一：「西ナイル熱の現状」、*Medical Science Digest* Vol.31(14).548-549, 2005

2) 学会発表

国際会議における発表

Morita K.: Arboviral encephalitis infection in Asia: The Old and the New. German-Japanese Symposium on Emerging and re-emerging viruses (Toyama, Japan, May 14-17, 2005)

国内会議における発表

Afjal Hossain Khan, 福家 功, 石川 豊教, 井上 真吾, 森田 公一: 西ナイルウイルスに対する弱毒生ワクチン開発の試み. 第40回日本脳炎ウイルス生態学研究会・神奈川県 箱根, 2005年5月26-27日

Maria del Carmen Parquet, Phan Thi Nga, Manmohan Parida, Nguyen Thanh Thuy, Pham Thi Suu, Afjal Hossain Khan, Leonora T. D. Salda, Fuxun Yu, Shingo Inoue, Takashi Ito, Kouichi Morita: Novel Arbovirus in Vietnam: Isolation, Identification and Molecular Characterization. 第42回日本ウイルス学会九州支部総会・沖縄, 2005年7月8-9日

Afjal Hossain Khan, 福家 功, 石川 豊教, 井上 真吾, 森田 公一: 西ナイルウイルスに対する弱毒生ワクチン開発の試み. 第42回日本ウイルス学会九州支部総会・沖縄, 2005年7月8-9日

Fuxun Yu, Nor Shahidah Khairullah, Shingo Inoue, Vijayamalar Balasubramaniam, Futoshi Hasebe, Kouichi Morita: Expression of Nipah virus nucleocapsid protein in *Escherichia Coli* and its application in sero-diagnosis. 第42回日本ウイルス学会九州支部総会・沖縄, 2005年7月8-9日

Salda Leonora Trinidad Demot, Maria Del Carmen Parquet, Ronald R. Matias, Filipinas F. Natividad, Noboyuki Kobayashi, Kouichi Morita: Molecular epidemiology of dengue virus serotype 2 in the Philippines. 第46回日本熱帯医学会大会・京都, 2005年10月14-15日

井上真吾, Nemani Talemaitoga, Aryati,

Mohammed A. Islam, Efren M. Dimaano, Ronald R. Matias, Wimal Abeyewickreme, 大石和徳, Filipinas F. Natividad and 森田公一、第12回トガ・フラビ・ペスチ研究会(平成18年1月20日、東京)

「平成18年度」

1) 論文発表

Pareesh Sumatilal Shah, Mariko Tanaka, Afjal Hossain Khana, Edward Gitau Matumbi Mathenge, Isao Fuke, Mitsuo Takagi, Akira Igarashi, Kouichi Morita. Molecular characterization of attenuated Japanese encephalitis live vaccine strain ML-17. *Vaccine* Vol.24 402-411, 2006.

Wei-Feng Tang, Yuki Eshita, Masayuki Tadano, Kouichi Morita and Yoshihiro Makino. Molecular basis for adaptation of a chimeric dengue type4/Japanese encephalitis virus to vero cells. *Microbiol. Immunol.*, Vol.49:285-294, 2005.

Manmohan Parida, Kouhei Horioko, Hiroyuki Ishida, Paban Kumar Dash, Parag Saxena, Asha Mukul Jana, Mohammed Alimul Islam, Shingo Inoue, Norimitsu Hosaka, and Kouichi Morita. Rapid Detection and Differentiation of Dengue Virus Serotypes by a Real-Time Reverse Transcription-Loop-Mediated Isothermal Amplification Assay. *J. Clin. Microbiol.* Vol.43: 2895-2903, 2005.

Celia C. Carlos, Kazunori Oishi,* Maria T. D. D. Cinco, Cynthia A. Mapua, Shingo Inoue, Deu John M. Cruz, Mary Ann M. Pancho, Carol Z. Tanig, Ronald R. Matias, Kouichi Morita, Filipinas F. Natividad, Akira Igarashi, And Tsuyoshi Nagatake. 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, 435-440, 2005.

Fuxun Yu, Mai Quynh Le, Shingo Inoue, Hong Thi Cam Thai, Futoshi Hasebe, Maria del Carmen Parquet, Kouichi Morita. Evaluation of Inapparent Nosocomial Server Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Infection in Vietnam by use of Highly Specific Recombinant Truncated Nucleocapsid Protein-Based Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*. Vol.12, 848-854, 2005.

Leonora T.D. Salda, Maria D.C. Parquet, Ronald R. Matias, Filipinas F. Natividad, Nobuyuki Kobayashi, Kouichi Morita. Molecular Epidemiology of dengue 2 viruses in the Philippines: Genotype shift and local evolution. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* Vol. 73, 796-802, 2005

Nawa M., Takasaki T., Ito M., Inoue S., Morita K., and Kurane I. Immunoglobulin A Antibody Responses in Dengue Patients: a Useful Marker for Sero diagnosis of Dengue Virus Infection. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*. Vol.12, 1235-1237, 2005.

森田公一:「デング熱、デング出血熱」、今日の治療指針 2005, p143, 2005.

森田公一:「国際感染症、日本脳炎」、臨床看護、Vol. 31, 169-172, 2005.

森田公一:「西ナイル熱・脳炎 - 最近の動向」、長崎市医師会報、Vol. 39, 14-16, 2005

森田公一:「バイオセーフティ」 in 標準微生物学 (第9版)、山西弘一 監修、医学書院、2005

森田公一:「ウエストナイル熱に対するワクチン」臨床とウイルス、Vol. 33, 28-32. 2005

森田公一:「ウエストナイル熱」モダン フィジシャン、Vol. 25, 523-526. 2005.

森田公一:「ウエストナイル熱とワクチン開発の現状」感染症、Vol. 35, 91-96. 2005.

森田公一:「フラビウイルスによる疾患 (ウエストナイル熱、デング熱を中心に)」カレントセラピー、Vol. 27, 722-724, 2005.

森田公一:「ウエストナイル脳炎」、*Infectious Disease Report* 2005, No28, 2005.

森田公一:「ウエストナイルウイルス」、*Drug Delivery System*. Vol. 20(5). 556-557, 2005.

森田公一:「西ナイル熱の現状」、*Medical Science Digest* Vol. 31(14). 548-549, 2005

2) 学会発表

国際会議における発表

Morita K.: Arboviral encephalitis infection in Asia: The Old and the New. *German-Japanese Symposium on Emerging and re-emerging viruses (Toyama, Japan, May 14-17, 2005)*

国内会議における発表

Afjal Hossain Khan, 福家 功, 石川 豊教, 井上 真吾, 森田 公一: 西ナイルウイルスに対する弱毒生ワクチン開発の試み. 第40回日本脳炎ウイルス生態学研究会・神奈川県 箱根, 2005年5月26-27日

Maria del Carmen Parquet, Phan Thi Nga, Manmohan Parida, Nguyen Thanh Thuy, Pham Thi Suu, Afjal Hossain Khan,

Leonora T. D. Salda, Fuxun Yu, Shingo Inoue, Takashi Ito, Kouichi Morita: Novel Arbovirus in Vietnam: Isolation, Identification and Molecular Characterization. 第42回日本ウイルス学会九州支部総会・沖縄, 2005年7月8-9日

Afjal Hossain Khan, 福家 功, 石川 豊教, 井上 真吾, 森田 公一: 西ナイルウイルスに対する弱毒生ワクチン開発の試み. 第42回日本ウイルス学会九州支部総会・沖縄, 2005年7月8-9日

Fuxun Yu, Nor Shahidah Khairullah, Shingo Inoue, Vijayamalar Balasubramaniam, Futoshi Hasebe, Kouichi Morita: Expression of Nipah virus nucleocapsid protein in *Escherichia Coli* and its application in sero-diagnosis. 第42回日本ウイルス学会九州支部総会・沖縄, 2005年7月8-9日

Salda Leonora Trinidad Demot, Maria Del Carmen Parquet, Ronald R. Matias, Filipinas F. Natividad, Noboyuki Kobayashi, Kouichi Morita: Molecular epidemiology of dengue virus serotype 2 in the Philippines. 第46回日本熱帯医学会大会・京都, 2005年10月14-15日

井上真吾, Nemani Talemaitoga, Aryati, Mohammed A. Islam, Efren M. Dimaano, Ronald R. Matias, Wimal Abeyewickreme, 大石和徳, Filipinas F. Natividad and 森田公一, 第12回トガ・フラビ・ペスチ研究会(平成18年1月20日、東京)

「平成19年度」

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、石川豊数、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、北畠正大、井上真吾、米田美佐子、森田公一、松島綱治、小原道法: SARS-CoV ス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

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(総合報告書)

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のアミノ酸配列長が粒子産生効率に大きな影響を与えることを明らかにし、VLP産生効率を最適化することに成功した。平成18年度はVLPが強い中和活性を持つモノクローナル抗体への反応性を有しており、直径20-25nmの粒子構造を形成していることを明らかにした。平成19年度は、VLP抗原産生細胞株の樹立を試み、CHO-K1細胞についてVLPを恒常的かつ高効率に産生するクローンを選択した。さらに、精製した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。平成19年度は、VLP抗原産生細胞株樹立を試みた。

B. 研究方法

(平成17年度)

NY99株からのcDNAクローニング

(ア) 試料よりRNAを調整し、逆転写酵素反応、

PCRによりcDNAを合成しプラスミドへクローニングした。

(イ) cDNAのシーケンスを確認した。

VLP発現プラスミドの構築

上記プラスミドからプライマーを組み合わせてPCRを行った。カプシド蛋白質の第1アミノ酸を1とした。発現開始点を98番目から109番目のアミノ酸まで一つずつずらし、翻訳開始コドンを加え、E蛋白質のC末791番目のアミノ酸までをcDNAとして作製した(図1)。これらcDNAをそれぞれ哺乳類細胞発現ベクターへサブクローニングした。さらに、prM蛋白質の間(図1, #13)、及び、M蛋白質のN末付近(図1,

#14)から E 蛋白質の C 末 791 アミノ酸までを発現するプラスミドも作製した。

発現抗原の解析：

(ア) E 蛋白質に対するモノクローナル抗体 402 及び HRP でラベルした 402 を用いて E 蛋白質のエピトープを複数有する分子の ELISA 定量系を準備した。この ELISA では TritonX-100 を加えることにより E 蛋白質の検出が不能になることから、粒子構造の E 蛋白質を認識すると考えられる。

(イ) 各プラスミドを 293T 細胞へ導入し上清中の E 蛋白質を ELISA によって定量した。

(ウ) 上清を 100000 x g で超遠心し、ペレットを抗 JEV 抗体及び抗 WNV-M 抗体によりウエスタンブロット解析した。

(エ) プラスミドを導入した細胞内蛋白質も同様にウエスタンブロット解析した。

(オ) 上清へ蛋白質を産生しないクローンではシグナルシーケンスのアミノ酸長を一つ増やした発現プラスミドを作製し、上清の蛋白質産生の変化を調べた。

細胞内局在の解析：

上清へ効率よく E 蛋白質を放出する構築体(図 1 #12)及び産生しない構築体(図 1, #7)をそれぞれ EGFP と融合させ、細胞内での局在を調べた。

培養上清中の E 蛋白質の解析：

(ア) 効率よく E 蛋白質を発現するプラスミド(図 1 #12)を 293T 細胞へ導入し上清 100 mL を超遠心した。

(イ) ペレットを 20-60% 平衡ショ糖密度勾配法によってフラクション中の E 蛋白質を ELISA によって定量した。

(ウ) 最も E 蛋白質を含むフラクションを濃縮し、ネガティブ染色後電子顕微鏡観察を行った。

(平成 18 年度)

VLP の形態観察：

(ア) 効率よく prM-E 抗原を産生させるプラスミド(図 1 #12)を 293T 細胞へ導入した。

(イ) 上清をセントリプレップ YM100 で濃縮し、SW41 ローターを用いた 20-60% 平衡ショ糖密度勾配法によってフラクションに分けた。

(ウ) フラクション中の E 蛋白質を 402 抗体を用い、ELISA によって定量した(図 3)。

(エ) 二つのピークフラクションをそれぞれ濃縮し、ネガティブ染色後、電子顕微鏡によって観察した(図 4)。

モノクローナル抗体 WNY11 の中和活性：

(ア) E 蛋白質に対するモノクローナル抗体 WNY11 由来の腹水希釈系列 (25000, 50000, 100000, 200000 倍) を作成した。

(イ) ウエストナイルウイルス (NY99, 400 pfu/mL) を調整した。

(ウ) 37°C、90 min 反応させ (200 pfu/mL)、Vero E6 へ感染させた。

(エ) 3 日後、プラークを観察した。

WNY11 抗体による ELISA：

(ア) prM-E 抗原を含む上清を 20-60% 平衡ショ糖密度勾配法によって分画した。

(イ) キャプチャー抗体として WNY11、検出抗体として HRP でラベルした WNY11 を用いて ELISA を行った(図 5)。

中和抗体誘導能 (プラークアッセイ) の解析：

(ア) 濃縮 VLP を 4 匹の BALB/c マウスに免疫した。

(イ) 非免疫マウスを含め血清の希釈系列 (80, 320, 1280 倍) を作成した。

(ウ) ウエストナイルウイルス (NY99, 400 pfu/mL) を調整した。

(エ) 37°C、90 min 反応させ (200 pfu/mL)、Vero E6 へ感染させた。

(オ) 3 日後、プラークを観察した。

(平成 19 年度)

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 1 #12)を導入した。
- (イ) 遺伝子導入細胞を限界希釈後、プラスト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 6 A, #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 6 A, #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 6 A, #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 6, #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 6 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 7)。
- (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

クッションを抗 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 6 #22.6)、無血清培地馴化クローン(図 6 #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

(平成 17 年度)

- (ア)各発現プラスミドを 293T 細胞へ導入し、上清中の E 蛋白質を定量したところ、シグナルシーケンスを構成するアミノ酸鎖長は規則的に産生蛋白質量を調節していた(図 1)。
- (イ)prM 蛋白質の中間(図 1 #13)、或いは、M 蛋白質の N 末近傍(図 1 #14)を開始点とする発現プラスミド導入では全く上清に E 蛋白質を認めなかった。
- (ウ)cDNA を導入した細胞内蛋白質のウエスタ

ンブロットでは E、prM、M 蛋白質が検出された(図 2)。最も長いシグナルシーケンスを有する発現蛋白質には prM と E 蛋白質の間の切断が認められなかった(図 1 #1)。全く上清に E 蛋白質を産出させないシグナルシーケンスを有するコンストラクト(図 1 #7)では E 蛋白質が少なく、prM 蛋白質を認めなかった(図 2)。

(エ)ELISA により抗原性が確認できた蛋白質ではウエスタンブロットによっても E、prM、M 蛋白質を認めた(図 2)。

(オ)上清に蛋白質を産出させないシグナルシーケンス(図 1 #7)にアラニンが付加し発現させたところ、細胞内 prM 蛋白質が増加し、上清へ E 蛋白質を効率良く産生するようになった。

(カ)上清へ効率よく E 蛋白質を産出させるシグナルシーケンス(図 1 #12)を有する融合蛋白質は細胞室内のゴルジと考えられる器官へ集積していることが判明した。

(キ)平衡シヨ糖密度勾配法によって E 蛋白質は比重約 1.19g/mL を示すフラクションへ集積していた。

(ク)ネガティブ染色によって直径約 25 nm の粒子構造を電子顕微鏡観察で認めた。

(平成 18 年度)

(ア) prM-E 発現プラスミドを 293T 細胞へ導入し、上清中の E 蛋白質を定量したところ、平衡シヨ糖密度勾配遠心上、二つのピークがあることが判明した(図 3)。

(イ)ピークフラクションをそれぞれ濃縮しネガティブ染色した。電子顕微鏡によって観察したところ、比重 1.11g/mL のフラクションには球体状の直径約 25 nm の構造体を認めた。比重 1.16g/mL には直径 20 nm 程度につぶれた球体の集積像が認められた(図 4)。

(ウ)モノクローナル抗体 WNY11 の腹水は 20 万

倍希釈を行っても WNV によるプラーク形成を 78%減少させることができた。

(エ) WNY11 による平衡シヨ糖密度勾配のフラクション ELISA でも中和活性のない 402 抗体と同様、二相性のピークを認めた(図 5)。

(オ) VLP の免疫後血清は 80 倍希釈で 50%以上のプラーク形成阻害を示す、中和活性能が認められた。

(平成 19 年度)

(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 6A #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 6A #22.6)。2 度目の再クローニングで、得られたクローン(図 6A #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 6 #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 6B #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 7)。

(オ) シヨ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

(平成 17 年度)

シグナルシーケンスが粒子産生効率に大きな影響を与えることが判明した。また、これを裏づけ、発現効率の高いシグナルを有する融合蛋白質はゴルジと考えられる器官に集積した。シグナルシーケンス長と上清への E 蛋白質放出効率との間には、7 アミノ酸周期の規則性があった。産生しないクローンのシグナルシーケンスへアミノ酸を一つ付加すると E 蛋白質産生が回復したことから、アミノ酸の特異性よりもアミノ酸数を認識してゴルジへの取り込みを促進する機構があると考えられた。

上清への E 蛋白質産生と細胞内での prM 蛋白質発現は一部一致しないクローンがあった。粒子中には prM、M を必ず認めたことから粒子中へ prM が取り込まれることが出芽には必須であると考えられた。

上清への発現効率の高い蛋白質は 20-60% 平衡シヨ糖密度勾配遠心法で比重 \approx 1.19g/mL の画分に単一のピークを示した。また、電子顕微鏡で粒子様構造が観察されたことも、産生された蛋白質が粒子を形成していることを示唆した。

これらのことから、VLP 抗原産生細胞株樹立の基盤を確立できたものと思われる。

(平成 18 年度)

効率の良いシグナルシーケンスによって産生された WNV VLP は、平衡シヨ糖密度勾配遠心法で比重 1.16 g/mL 及び 1.11 g/mL の画分に形態上、異なる二相性ピークを示すことが判明した。形態から推測すると 1.16 g/mL の集積像は 1.11 g/mL の VLP によるものであると考えられた。

E 抗原に対するモノクローナル抗体 WNY11 の腹水の中和活性は非常に強いことが判明した。WNY11 を用いた ELISA によっても同じ比重での二相性ピークを示したため、それぞれの VLP が中和活性誘導能を有すると考えられた。

さらに、濃縮した VLP を BALB/c マウスに免疫した血清は中和活性を示したことから、VLP 抗原産生細胞株を樹立し、ウイルスチャレンジ実験を行う基盤を確立できたと考えられた。

(平成 19 年度)

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。シヨ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

シグナルシーケンスが粒子産生効率に大きな影響を与え、そのアミノ酸配列長には周期規則性のあることが判明し、最も発現効率の高い prM-E cDNA を構築することができた。

VLP の粒子形態と中和エпитープについて調べた結果、VLP 産生細胞の上清を平衡シヨ糖密度勾配遠心法で分画して得られたピークは、強い中和活性を有するモノクローナル抗体を使用した ELISA に対する反応性を有していることが判明し、また電子顕微鏡で粒子構造が観察されたことから、中和エпитープを保持した、均一な VLP が産生されていると考えられた。

以上の一過性発現の実験結果を踏まえて、WNV VLP を持続的に、かつ高効率に産生する CHO 細胞クローンの樹立を行い、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。

高橋秀宗、前田才恵、田中道子、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 54 回日本ウイルス学会学術集会、2006 年 11 月、名古屋。

吉井洋紀、Pranee Somboonthum、山岸義晃、岡本成史、小島朝人、石川豊数、山西弘一、森康子：日本脳炎ウイルス Virus-Like Particle (VLP) を用いたワクチン効果の検討—アジュバント併用投与に関して—。第 10 回日本ワクチン学会学術集会、2006 年 10 月、大阪。

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 シグナルシーケンス長を変えた prM-E 発現プラスミドの構築と上清中の E 蛋白の定量 (抗 E モノクローナル抗体 402 による ELISA 定量結果を示した)

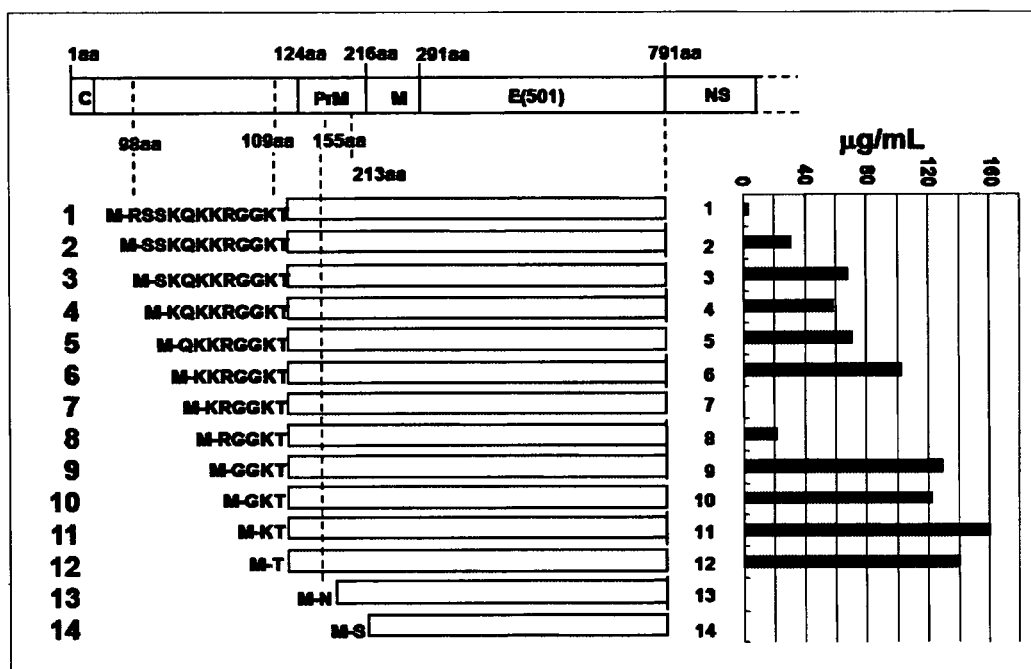


図 2 発現プラスミド導入細胞と培養上清の超遠心ペレット(virion)のウェスタンブロット

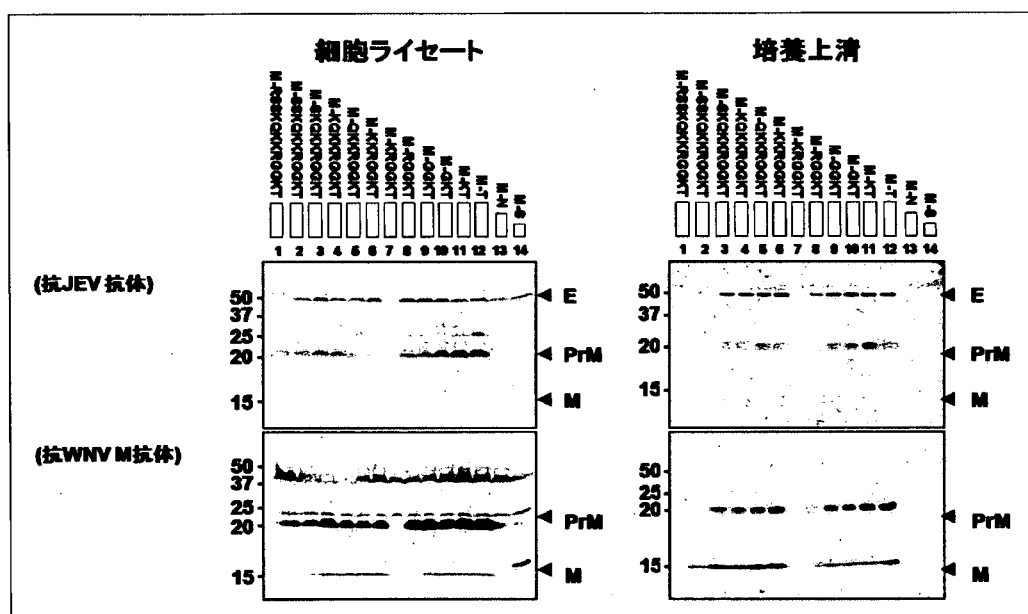


図3 prM-E 抗原産生 293T 細胞の上清を平衡シヨ糖密度勾配法にて分画。
抗 E 抗体 402 によって ELISA を行った。

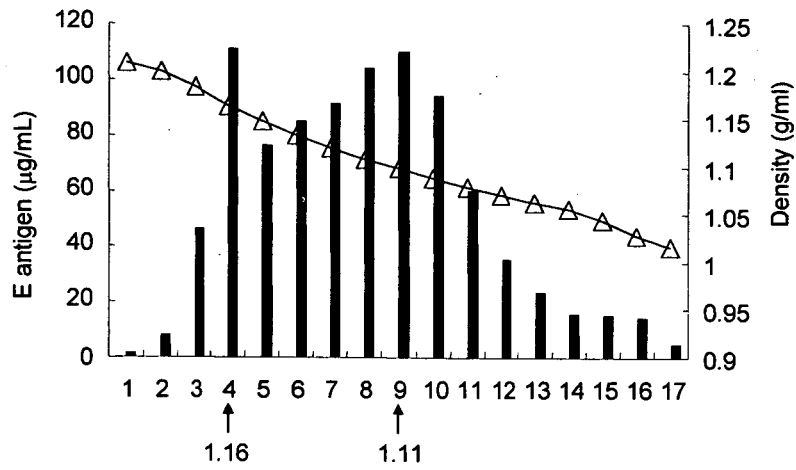


図4 平衡シヨ糖密度勾配法で比重 1.16、1.11g/mL を示すフラクシヨンのネガティブ染色電顕像

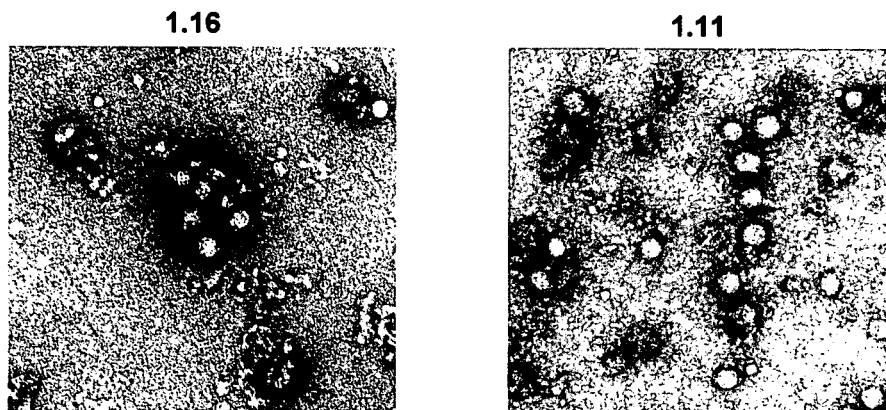


図5 prM-E 抗原産生 293T 細胞の上清を平衡シヨ糖密度勾配法にて分画。
中和活性を有する NY11 によって ELISA を行った。

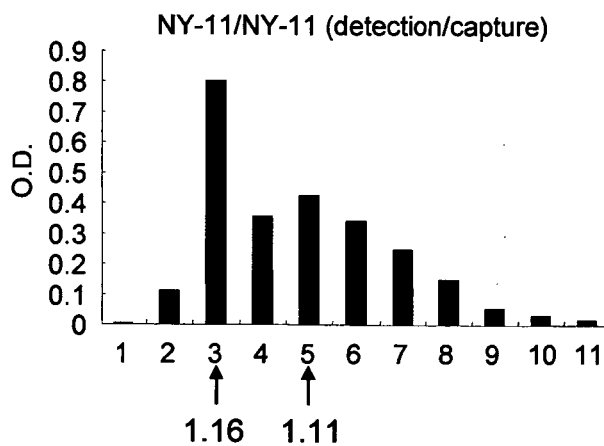
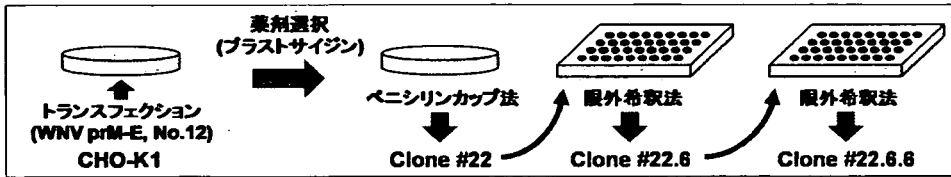


図6 VLP 持続発現 CHO 細胞クローンの樹立

(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。

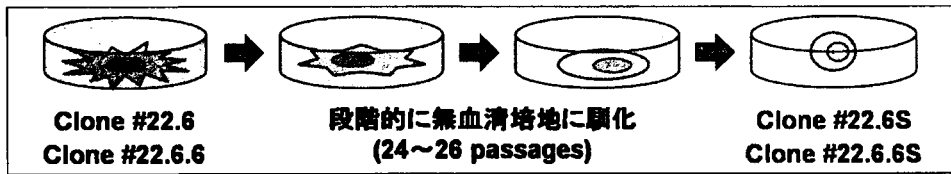
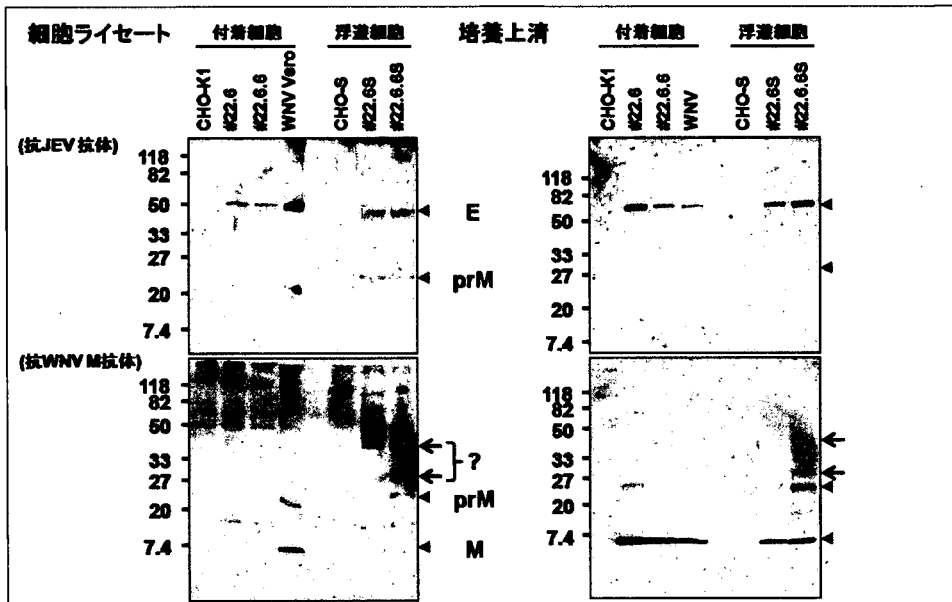


図7 prM-E 持続発現 CHO 細胞クローンについて、細胞内および培養上清の抗原プロセッシングを、ウエスタンブロット法により解析した



厚生労働省研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）

分担総合研究報告書

フラビウイルスワクチン用アジュバント開発に関する研究

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

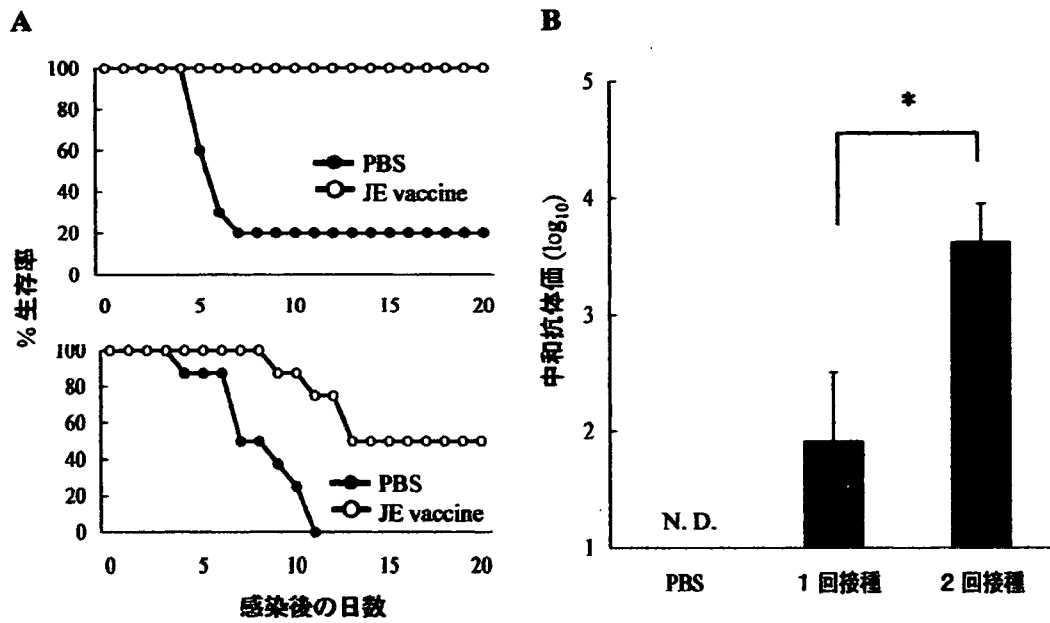


図1 JE ワクチンの接種回数による防御免疫効果の変化. JEワクチンの2回接種(上)と1回接種(下)でのJEV感染に対する生存率の変化 (A)と抗JEV中和抗体価 (B)を示す. *, $p < 0.05$, N.D.; 検出限界以下.

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)(JaTH160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 μ g)をalum(100 μ g)あるいは γ -PGA-NPs(100 μ g)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 JaTH160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