

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  $\gamma$ -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  $\gamma$ -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  $\gamma$ -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と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つた。
2. JE ワクチンに alum あるいは  $\gamma$ -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( $\gamma$ -glutamic acid) nanoparticles provides effective protection from Japanese encephalitis virus. *Vaccine* 26:589-594, 2008.

##### 2. 学会発表

1. 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 Particles (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 (大阪) 2006年10月21-22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 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
3. 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- $\gamma$ -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、  
石川豊教、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

厚生労働省科学研究費補助金 新興再興感染症研究事業  
分担総合研究報告書

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LD<sub>50</sub>算出の再試験で  
使用した静脈内 ( $8 \times 10^1$  -  $8 \times 10^5$  pfu/head, n=5-7) あるいは皮下接種 ( $4 \times 10^2$  -  $4 \times 10^6$  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。

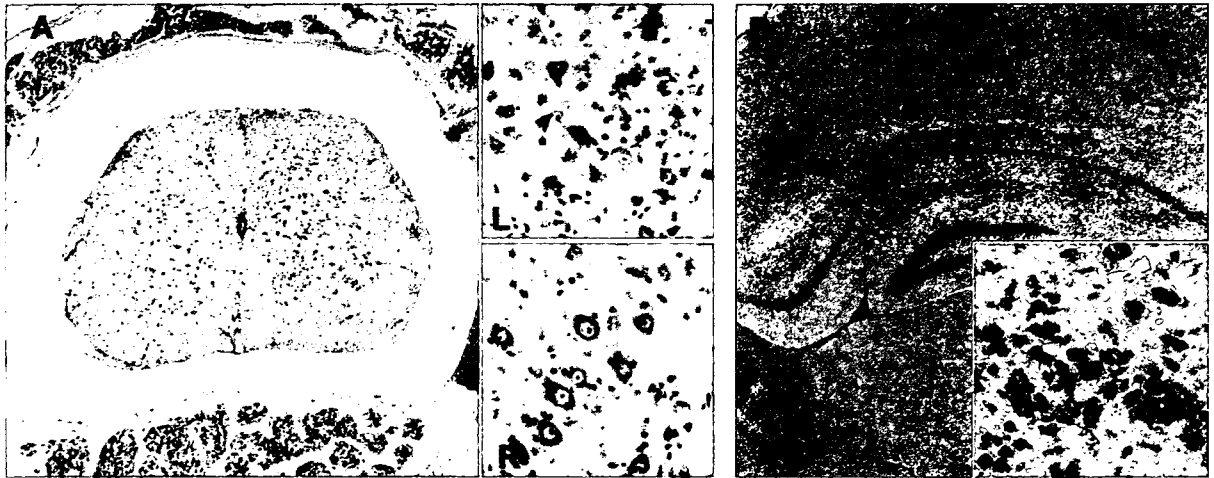


図1 A: 左後肢に弛緩性麻痺を示した個体の腰髄組織病変 (Klüver Barrera luxol fast blue 染色)。左側前角の運動神経細胞は壊死、脱落し、軽度な炎症性細胞浸潤が認められた (L)。右側の運動神経細胞は正常であった (R)。B: 一過性の体重減少が認められた個体の大脳海馬における炎症所見 (HE 染色)。海馬の神経細胞の脱落とそれに伴うミクログリアの軽度な浸潤が認められた(挿入図)。

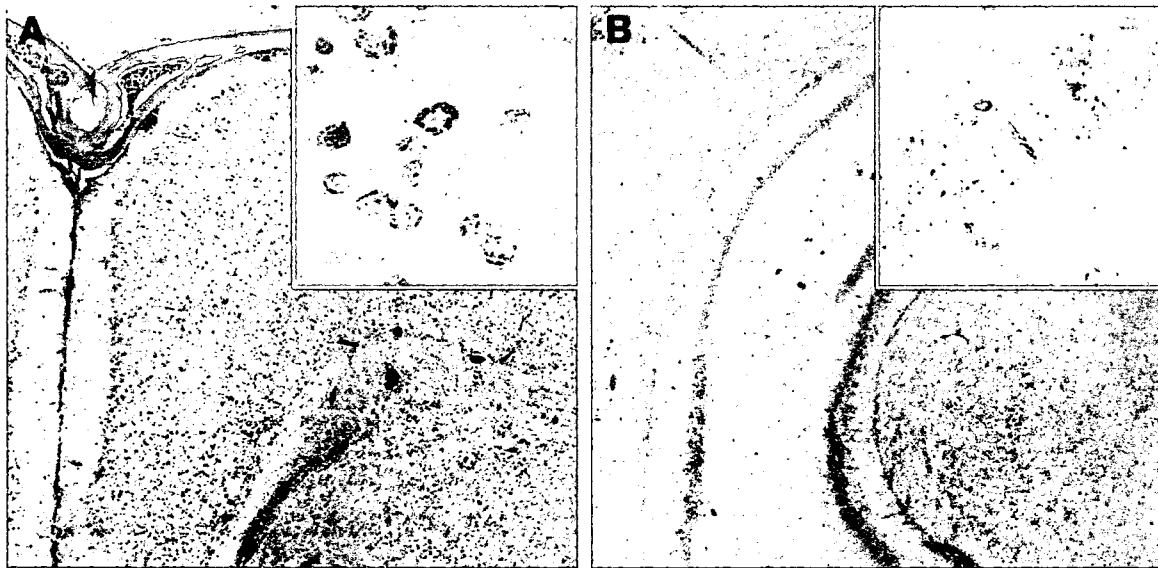


図2 脳炎症状を呈し、瀕死となった個体の大脳皮質および海馬(HE 染色。挿入図、免疫組織化学)。A: 大脳皮質の神経細胞は HE 染色において形態変化に乏しいが、この部位のほとんどの神経細胞の細胞質においてウイルス抗原が陽性であった(挿入図)。B: 海馬の神経細胞も同様に形態変化に乏しいが、ウイルス抗原が弱陽性であった(挿入図)。

厚生労働科学研究費補助金（新興再興感染症研究事業）

（総合）研究報告書

ウエストナイルウイルス（WNV）のリバースジェネティクスを用いた WNV 感染症の新規  
検査法および新規ワクチンとしての弱毒化ウイルス作製に関する研究

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

研究要旨：ウエストナイルウイルス（WNV）の日本への侵入に備え、WNV 感染症の診断法や抗ウイルス薬のスクリーニング法の開発、新規ワクチン候補の作製を目的として、WNV のリバースジェネティクス法を開発した。(1) ウイルスの構造蛋白質である prM と E 蛋白質を哺乳類動物細胞に発現させることにより、ウイルスの中空ウイルス粒子 (Subviral particles, SvPs) を作製した。(2) ウイルスの構造蛋白質遺伝子の大部分を除去することによって、転写可能であるが粒子形成を欠損したウイルスのレプリコン RNA、(3) レプリコンをウイルスの構造蛋白質と共発現することによって、レプリコンをパッケージングしたウイルス様粒子 (Virus-like particles, VLPs)、そして (4) 弱毒組み換えウイルスを作製した。これらの方法は WNV 感染症の診断や抗ウイルス薬、ワクチンの開発等に有効なツールとなるものと考えられる。

協力研究者

前田 潤子 北海道大学大学院獣医学  
研究科 研究補佐員  
橋本 新吾 北海道大学大学院獣医学  
研究科 学生  
高木 弘隆 国立感染症研究所バイオ  
セーフティー管理室 研究員  
苅和 宏明 北海道大学大学院獣医学  
研究科 准教授  
高島 郁夫 北海道大学大学院獣医学  
研究科 教授  
倉根 一郎 国立感染症研究所ウイルス  
第一部 部長

A. 研究目的

1937 年、アフリカのウエストナイル地方で初めて同定されたウエストナイルウイルス（WNV）は、その後、アフリカやヨーロッパ等で散発的な流行を繰り返している。北アメリカでは、1999 年にニューヨークで初めて WNV 感染症の流行が起

こった。その後、数年の内に合衆国のほぼ全土に広がり、今日ではカナダや中南米に至るまでその感染が拡大している。日本においては、2005 年 10 月にアメリカ合衆国からの帰国者で WNV の感染が認められた一例のみ報告されている。しかし、あらゆる面でグローバル化された現代社会において、他岸に発生した WNV 感染症の流行が日本に侵入する危険性は高いものと考えられる。

そこで、平成 18 年度から平成 19 年度の厚生労働科学研究費補助金（新興再興感染症研究事業）「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」において、WNV の日本への侵入に備えた WNV 感染症の診断法の開発、抗ウイルス薬のスクリーニングや新規ワクチン候補の作製を目的として WNV のリバースジェネティクス法を開発した。



## B. 研究方法

### 1. 中空ウイルス粒子 (Subviral particles, SvPs) の作製

WNV の構造蛋白質遺伝子 (C 蛋白質の C 末端領域を含む prM、E 蛋白質) を哺乳類動物細胞での発現ベクター pCAGGS に組み込んだ (pCAGGS WNV SvPs)。pCAGGS WNV SvPs を HEK293T 細胞に導入し、培養上清中に放出された SvPs を回収、精製した (図 1)。

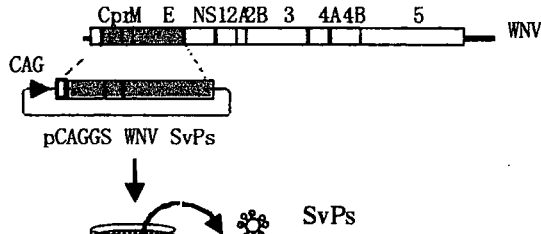


図1.WNV 中空ウイルス粒子(Subviral particles, SvPs)の作製  
WNVの構造蛋白質コーディング領域 (CのC末端に存在するシグナル配列から、PrM、E蛋白質まで) のcDNAを、哺乳類細胞発現ベクターpCAGGSに組み込み、細胞に導入した。導入後、72時間に培養上清を回収し、SvPs溶液とした。CAG: CAGプロモーター配列を示す。

### 2. レプリコンの作製

WNV ゲノム RNA の cDNA より構造蛋白質領域を欠失させた cDNA 配列の 5'末端に SP6 RNA ポリメラーゼのプロモーター配列を付加した。SP6 RNA ポリメラーゼを用いて WNV レプリコンを *in vitro* で合成した。WNV レプリコンを HEK293T (293T)、Baby hamster kidney (BHK) や Vero 細胞に導入した (図 2)。

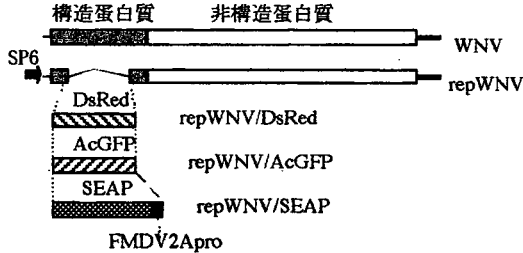


図2. WNV レプリコンの模式図  
WNVのcDNAからウイルスの構造蛋白質の大部分を取り除き、pUC19由来のプラスミドに組み込み、レプリコンを作製した(repWNV)。repWNVの構造蛋白質除去部位に、レプリコン発現のレポーター遺伝子として赤色(DsRed)および緑色蛍光色素(AcGFP)遺伝子、あるいは分泌型アルカリフォスファターゼ(SEAP)遺伝子を組み込んだレプリコン(それぞれ、repWNV/DsRed、repWNV/AcGFPあるいはrepWNV/SEAP)を作製した。SEAPは細胞内でFreeな状態で発現させるため、そのC末にFMDVの2Apro遺伝子を挿入した。

### 3. ウイルス様粒子 (Virus-like particles, VLPs) の作製

研究方法 2 で作製したレプリコンを WNV の構造蛋白質と各哺乳動物細胞に共発現することにより、培養上清中に WNV の VLPs を産生させた。レポーター遺伝子として赤色 (DsRed) および緑色蛍光色素 (AcGFP) 遺伝子や分泌型アルカリフォスファターゼ (SEAP) 遺伝子をレプリコンに導入した (図 3)。

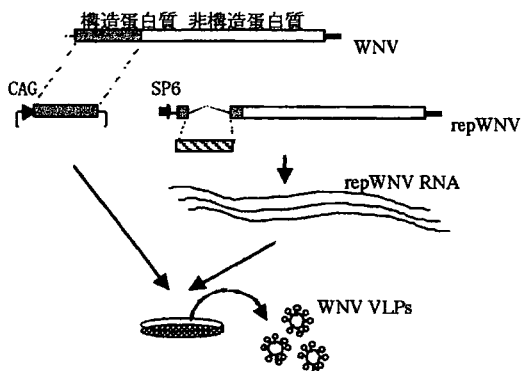


図3.WNVウイルス様粒子(Virus-like particles, VLPs)の作製  
WNVのレプリコンとWNVの構造蛋白質を細胞に共発現することで、培養上清中にVLPsの産生が認められた。CAG: CAGプロモーター配列、SP6: SP6プロモーター配列を示す。

### 4. 組み換えウイルスの作製

WNV の完全長 cDNA クローンの作製は技術的に困難であったため、PCR により WNV の完全長 cDNA を合成した。WNV の cDNA 配列の 5'末端に SP6 RNA ポリメラーゼのプロモーター配列を付加し、SP6 RNA ポリメラーゼを用いて感染性 RNA を合成した。感染性 RNA を 293T、BHK および Vero

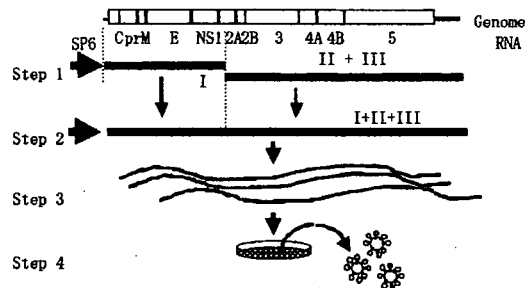


図4. 組み換えWNVの作製方法  
WNV cDNA IとII+IIIをPCRにより増幅し(Step 1)、これらを鋳型として完全長(I+II+III) cDNAをPCRにより合成した(Step 2)。完全長のWNV cDNAの5'末端にはSP6 RNAポリメラーゼのプロモーター配列を付加した。次に完全長のWNV cDNAを鋳型として、SP6 RNAポリメラーゼを用いて、感染性RNAを*in vitro*で合成した(Step 3)。この感染性RNAを細胞に導入し、培養上清中に分泌された組み換えウイルスを回収した(Step 4)。

細胞に導入することにより、培養上清中に放出された感染性の組み換えウイルス粒子を回収した(図4)。

### C. 研究結果

#### 1. SvPsの作製

WNVと日本脳炎ウイルス(JEV)のSvPsを作製し、これらを抗原としたELISA法やIFA, Western blot解析により各ウイルスの感染抗血清を鑑別することが出来た。しかし、各感染抗血清と抗原として用いた両ウイルスのSvPsは弱い交差反応を示した(図5)。

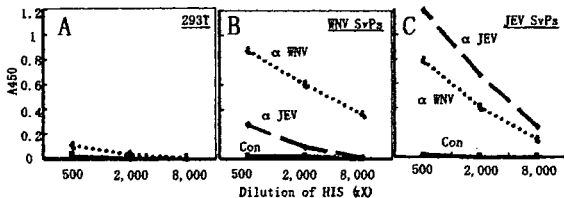


図5. WNVおよびJEVのSvPsを抗原として用いた、WNVおよびJEV感染抗血清のELISA法による鑑別。WNV(B)およびJEVのSvPs(C)を293T細胞で産生し、これらを抗原としたELISA法により両ウイルス感染血清の反応性を検討した。陰性コントロールとして293T細胞の培養上清(A)を用いた。WNVのSvPsを抗原として用いた場合(B)、JEV感染血清に比べWNV感染血清を効率的に鑑別した。一方、JEVのSvPsを抗原として用いた場合(C)、WNV感染血清に比べJEV感染血清を効率的に鑑別した。

#### 2. レプリコンの作製

各種のレポーター遺伝子を発現するWNVレプリコンを作製した。レプリコンのウイルス構造蛋白質の欠失領域にレポーター遺伝子として、DsRedおよびAcGFP遺伝子やSEAP遺伝子を組み込んだ(それぞれrepWNV/NY/DsRed, repWNV/NY/AcGFPおよびrepWNV/NY/SEAP)(図2)。これら

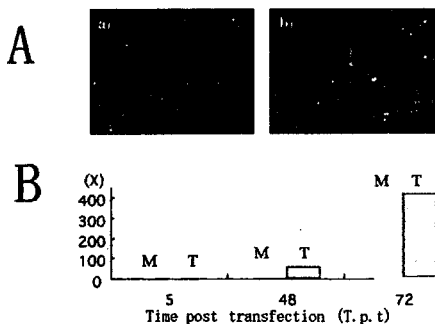


図6. レポーター蛋白質発現レプリコンのレポーター遺伝子の発現。A. 赤色(DsRed, a)および緑色(AcGFP, b)蛍光蛋白質発現WNVレプリコン(repWNV/DsRedおよびrepWNV/AcGFP)を細胞に導入し、72時間後にレポーター遺伝子の発現を蛍光顕微鏡で観察した。B. 分泌型アルカリフォスファターゼ(SEAP)遺伝子を導入したWNVレプリコン(repWNV/SEAP, T)とコントロールのレポーター遺伝子を含まないWNVレプリコン(repWNV)を細胞に導入し、経時的に培養上清中に分泌されるSEAP量を測定した。グラフは0時間における培養上清中のSEAP量との比を表している。

のレプリコンは導入した哺乳類動物細胞において、それらレポーター蛋白質の発現が確認された(図6)。

#### 3. VLPsの作製

上述の各種レポーター蛋白質発現WNVレプリコンをWNVの構造蛋白質と細胞に共発現させ、WNVのVLPsを作製した。また、JEVの構造蛋白質と細胞に共発現させることにより、JEVの構造蛋白質を殻とするVLPsを作製できた(図7)。

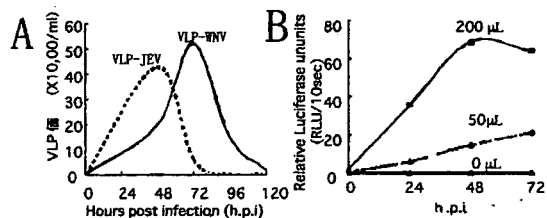


図7. レポーター蛋白質発現VLPのレポーター遺伝子の発現。A. repWNV/DsRedをWNVあるいはJEVの構造蛋白質と共発現することにより、WNVあるいはJEVの構造蛋白質の殻を持つVLP(それぞれVLP-WNV(実線)、VLP-JEV(破線))産生の経時的増加を観察した。B. 分泌型アルカリフォスファターゼ(SEAP)遺伝子をレポーターとするVLP(VLP-WNV/SEAP)を各200(■)、50(◆)、0(▲)μL細胞に感染し、経時的に培養上清中に分泌されるSEAP量を測定した。

#### 4. 組み換えウイルスの作製

WNVの病原性に関与すると考えられている、WNV E蛋白質の糖鎖付加配列(ウイルスのポリプロテインのN末端より446番目のアミノ酸)に変異を導入し、糖鎖付加のないE蛋白質を持つ組み換えウイルスを作製した。本組み換えウイルス

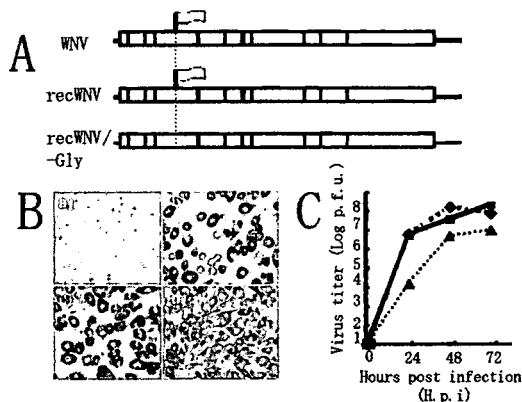


図8. 粒子形成と細胞変性効果(CPE)に及ぼすWNV E蛋白質の糖鎖付加の影響。

A. WNVウイルス(WNV)および組み換えウイルス(recWNV)、糖鎖付加配列を除去した組み換えウイルス(recWNV-Gly)のゲノムを模式的に示した。E蛋白質上の糖鎖付加部位を旗で示す。B. 各ウイルスのVeroE6細胞におけるCPEを示す。Mock(a)、あるいはWNV(b)、recWNV(c)、recWNV-Gly(d)を感染させた時のCPE。C. 各ウイルスの増殖曲線。WNV(■)、recWNV(◆)、recWNV-Gly(▲)をそれぞれ10 multiplicity of infection (m.o.i.) 感染後、経時的に培養上清中のウイルス価をブラックアッセイ法により測定した。

スは、(糖鎖付加が起こる) 野生型のウイルスに比べ、ウイルス粒子の形成が抑制されていた。また細胞に対する毒性効果も低く、WNV に対する新規ワクチン候補になるものと考えられた(図 8)。

#### D. 考察

本研究により確立した方法を用いて、WNV 感染症に対する以下の対策が可能となるものと考えられる。

1. SvPs : SvPs を抗原として用いた各種 WNV 検査および診断法の開発。SvPs を用いた WNV に対するワクチネーション等。
2. レプリコン : WNV の複製過程に作用する抗ウイルス薬のスクリーニング等。
3. VLPs : VLPs をウイルス粒子の代替として用いた各種 WNV 検査法の開発。ウイルスの感染、複製過程に作用する抗ウイルス薬のスクリーニング等。
4. 組み換えウイルス : ウイルスの感染、複製、粒子過程に作用する抗ウイルス薬のスクリーニングや新規ワクチン候補の作製等。

#### E. 結論

本研究により WNV のリバーシジェネティクス法を確立した。今後は、本法を用いて、安全かつ簡便な WNV の検査法を開発するとともに、新規 WNV ワクチンの開発に向けた予防対策について検討する必要がある。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Maeda, J., Ma, H., Sun, H., Ke, C.-G., Takagi, H., Kurane, I., Horiuchi, M., Ikuo, T., and Maeda, A. Epidemiological study of mosquitoes borne-Flaviviruses in Guangdong, China, 2005. *Medical Entomology and Zoology* 57: Suppl: 41, 2006
- 2) 吉野智生、国藤泰輔、渡辺竜己、久木田優美、前田秋彦、荻原克郎、大沼学、桑名貴、村田浩一、浅川満彦 輸入牧草に混入し北海道にてその死体

が確認されたホシムクドリ *Sturnus vulgaris* の記録とウイルス学的検査 北海道獣医師会雑誌 51:68-70, 2007

- 3) 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
- 4) 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
- 5) 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) 前田潤子、馬洪波、孫虹、柯昌文、高木弘隆、倉根一郎、堀内基広、高島郁夫、前田秋彦 2005年、中国・広東省珠海市で採取した蚊のフラビウイルス保有状況の調査 第58回日本衛生動物学会、長崎 (2006.4)
- 2) 前田秋彦、Ma Hongbo、Hong Sun、Ke Chuang-Wen、高木弘隆、前田潤子、堀内基広、高島郁夫、倉根一郎 アジアにおける蚊媒介性感染症の疫学的解析-中国を中心に- 第41回日本脳炎ウイルス生態学研究会、長崎 (2006.5)
- 3) 伊木繁雄、高木弘隆、後藤浩、川又亨、地主勝、森本洋、池田徹也、駒込理佳、木村浩一、清水俊一、山口敬治、前田秋彦、杉山和良、岡野素彦 地方衛研におけるバイオセーフティ研修実施の試み (第2報) 第6回日本バイオセーフティ学会、横浜 (2006.11)

- 4) 橋本新吾、前田潤子、高木弘隆、堀内基広、高島郁夫、倉根一郎、前田秋彦 ウエストナイルウイルスのレプリコンの作製 第54回日本ウイルス学会、名古屋 (2006.11)
- 5) 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)
- 6) 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学会、岩手 (2007.9)
- 7) 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)
- 8) 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)

#### G. 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

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）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、フラビウイルス科フラビウイルス属に属し、E-Protein Amino Acid Homology から日本脳炎ウイルス(JEV) やセントルイス脳炎ウイルスと非常に相同性が高く近縁であるため、日本脳炎血清型群 (Japanese encephalitis serocomplex ) と呼ばれている。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。国内においては 2005 年に初めて輸入症例ではあるが患者が確認されて、今後脅威な存在と認識すべき感染症の一つである。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、脳炎発症に伴い脳内に浸潤する T 細胞の詳細な解析を行った。また、フラビウイルス属のなかでも、特に日本脳炎ウイルス感染症は国内で 4 類感染症と規定されており疫学的重度は大きい。この研究班においては JEV 感染モデルにおいても同様の解析を行い、WNV との異同についても言及した。WNV 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 $\gamma$ 、IL-2、TNF $\alpha$  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 WNA 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非常に近似した WNV 抗原エピート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。WNV で得られた結果は JEV での検討と基本的には同一であったが、TCR レパトアの偏りは JEV とは異なり、それぞれに特異的な TCR を保有する T 細胞が脳内に浸潤している事が明らかとなった。

A. 研究目的

WNV 感染時に脳内に浸潤する T 細胞と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として、Adaptor-ligation PCR 法と Microplate-hybridization assay 法を用いた。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、WNV-specific T 細胞の応答を解析した。また、脳内浸潤 T 細胞の免疫学的意義については、脳内におけるサイトカインの発現パターンを解析する事により行った。

本研究により、T 細胞の詳細な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、新たなエピート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した。

## B. 研究方法

(1) 動物感染実験： 使用した WNV は NY99-6922 株を、JEV は JaTH160 株を使用した。感受性が高いことが知られる C3H/He の LD<sub>50</sub> 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 30LD<sub>50</sub>、JaTH160 株を 100 LD<sub>50</sub> 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した。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 感染および JEV 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 および JEV 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 $\gamma$ 、IL-2、IL-4、IL-5、IL-10、TNF $\alpha$ 、IL-17a、IL-17f、Tbet、GATA3、FOXP3、ROR $\gamma$ t のそれぞれのウイルス感染マウス脳中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 感染系の検討。

(1) 感染 10 日目の脳内には 4 個体に共通した特徴的 TCR レパトアの偏りとして、V $\alpha$  1-1,2-1、V $\beta$  5-2,8-2,11-1,16-1 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 $\alpha$  1-1、V $\alpha$  1-2、V $\alpha$  2-1、V $\beta$  5-2、V $\beta$  8-2、V $\beta$  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 $\alpha$  1-1、V $\alpha$  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 $\beta$  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 による脳内浸潤 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、IFN $\gamma$ 、IL-2、TNF $\alpha$  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。

### JEV 感染系の検討。

(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 $\alpha$  5-1,17-1,19-1、V $\beta$  2-1,8-3,13-1 を認めた。

CDR3 size spectratyping により clonality を検討した結果、V $\alpha$  5-1,11-1,18-1、V $\beta$  8-3,13-1 に clonality が観察された。これら TCR の CDR3 アミノ酸配列の結果、V $\alpha$  5-1,11-1,18-1、V $\beta$  8-3,13-1 に高頻度に同一もしくは近似したクローンが存在していた。

(2) リアルタイム PCR による脳内浸潤 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 $\gamma$ 、TNF $\alpha$  の上昇が認められ、Th1/Tc1 タイプであることが確認された。

#### 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 CDR3 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。また、同様に検討した JEV 脳炎モデルの解析結果から、Th1/Tc1 タイプの JEV-specific T 細胞の脳内浸潤が示唆された。この結果から、WNV および JEV 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ある。

WNV および JEV 特異的 T 細胞は共通した TCR レパトアを保有する事は無く、 $\beta$  鎖の J gene usage については WNV、JEV とともに BJ2.7,2.1 の頻度が高かった。以上の結果から、それぞれのウイルスに特異的に脳内に浸潤している事が明らかとなった。この事は、日本脳炎血清型として分類される相同性の高い WNV と JEV の T 細胞に認識されるエピトープは厳格に異なる可能が示唆された。

#### 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<sup>1,2,3)</sup>、北浦一孝<sup>1,2,3)</sup>、高崎智彦<sup>1)</sup>、鈴木隆二<sup>3)</sup>、倉根一郎<sup>1,2)</sup> (国立感染症ウイルス<sup>1)</sup>、筑波大院人間総合科学研<sup>2)</sup>、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<sup>3)</sup>)  
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
Wei-Feng Tang, Yuki Eshita, Masayuki Tadano, Kouichi Morita, Yoshihiro Maki no	Molecular basis for adaptation of a chimeric dengue type4/Japanese encephalitis virus to vero cells	Microbiol. Immunol	49	285-294	2005
森田公一	西ナイル熱・脳炎：最近の動向	長崎市医師会報	39	14-16	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	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	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	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	27	722-724	2005
森田公一	西ナイル熱の現状	Science Digest	31	548-549	2005
森田公一	ウエストナイルウイルス	Drug Delivery System	20	556-557	2005
小泉加奈子、中島由紀子、松崎真和、小井戸則彦、大曾根康夫、林昌宏、高崎智彦、倉根一郎、秋月哲史	本邦で初めて確認されたウエストナイル熱の輸入症例	感染症学雑誌	80	56-57	2006
林昌宏、倉根一郎	ウエストナイルウイルス	日本臨床	63	321-323	2005



林 昌宏, 高崎智彦	フラビウイルス脳炎-ウエストナイルウイルスを中心に	臨床病理	53	721-727	2005
林 昌宏, 高崎智彦	ウエストナイル熱脳炎	遺伝	59	37-42	2005
林 昌宏, 倉根一郎	ウエストナイルウイルスに関する最新の知見と対策	山口獣医学雑誌	32	1-12	2005
倉根一郎	アルボウイルス感染症におけるウエストナイル熱・脳炎の位置づけ	ウイルス	55	63-68	2005
倉根一郎	ウエストナイル熱・脳炎	臨床神経学	45	884-886	2005
Paresh Sumatilal Shah, Mariko Tanaka, Afjal Hossain Khan, Edward Gitau Matumbi Mathenge, Isao Fuke, Mitsuo Takagi, Akira Igarashi, Kouichi Morita	Molecular characterization of attenuated Japanese encephalitis live vaccine strain ML-17	Vaccine	24	402-411	2006
Parida, M. M., Morita, K. 他	Development and Evaluation of Reverse transcription-Loop-Mediated Isothermal Amplification Assay for Rapid and Real-Time Detection of Japanese Encephalitis Virus.	J.Clin. Microbiol.	44	4172-4178	2006
Hoshino K., Isawa H., Tsuda Y., Yano K., Sasaki T., Yuda M., Takasaki T., Kobayashi M. and Sawabe K.	Genetic characterization of a new insect flavivirus isolated from <i>Culex pipiens</i> mosquito in Japan.	Virology	359	405-414	2007
Higa, Y., Hoshino, K., Tsuda, Y., Kobayashi, M.	Dry ice-trap and human bait collection of mosquitoes in the eastern Hokkaido	Japan. Med. Entomol. & Zool.	57	93-98	2006
Hamano, M., Lim, C.K., Takagi, H., Sawabe, K., Kuwayama, M., Kishi, N., Kurane, I., Takasaki, T.	Detection of antibodies to Japanese encephalitis virus in the wild boars in Hiroshima prefecture, Japan.	Epidemiology and Infection	12	1-4	2007
森田 公一	西ナイルウイルスの現状と問題点	成人病と生活習慣病	36	910-913	2006
森田 公一	西ナイルウイルスとワクチン開発	感染炎症免疫	36	242-244	2006
鈴木智之、岡部信彦	注意すべき海外感染症の動向	成人病と生活習慣病.	36	820-824	2006

澤邊京子, 星野啓太, 伊澤晴彦, 佐々木年則, 伊藤美佳子, 高崎智弘, 江下優樹, 小林睦生	蚊からのウエストナイルウイルスの検出法および分離法の検討	Med. Entomol. & Zool.	57	279-286	2006
津田良夫, 比嘉由紀子, 葛西真治, 伊澤晴彦, 星野啓太, 林利彦, 駒形修, 澤邊京子, 佐々木年則, 富田隆史, 二瓶直子, 倉橋弘, 小林睦生	成田国際空港近接地と周辺地域の媒介蚊調査 (2003, 2004年)	Med. Entomol. & Zool.	57	211-218	2006
津田良夫, 比嘉由紀子, 倉橋弘, 林利彦, 星野啓太, 駒形修, 伊澤晴彦, 葛西真治, 佐々木年則, 富田隆史, 澤邊京子, 二瓶直子, 小林睦生	都市域における疾病媒介蚊の発生状況調査—ドライアイストラップを用いた2年間の調査結果—	Med. Entomol. & Zool.	57	75-82	2006
小泉加奈子, 中島由紀子, 松崎真和, 小井戸則彦, 大曾根康夫, 林昌宏, 高崎智彦, 倉根一郎, 秋月哲史	本邦で初めて確認されたウエストナイル熱の輸入症例	感染症学雑誌	80(1)	56-57	2006
林昌宏, 倉根一郎	ウエストナイル熱・脳炎の流行状況	臨床と微生物	33(4)	393-398	2006
林昌宏, 倉根一郎	ウエストナイル熱・脳炎	Pharma Medica	24(8)	15-20	2006
S. Okamoto, H. Yoshi, T. Ishikawa, T. Akagi, M. Akashi, M. Takahashi, K. Yamashita, Y. Mori	Single dose of inactivated Japanese encephalitis vaccine with poly( $\gamma$ -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., 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
Lim, C.K., Takasaki, T., Kotaki, A., Kurane, I.	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.	Viriology	In press	In press	2008