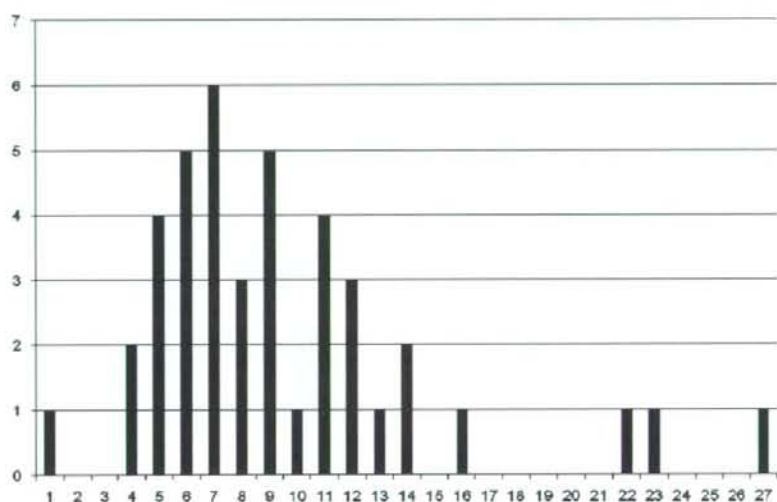


表1. 尿・唾液・血液からのデングウイルス遺伝子検出症例数と検出率 (61 症例中)

	デングウイルス検出			尿中ウイルス遺伝子の解析に至った症例
	尿	唾液	血液	
陽性数	27	5	37	8
検体数	61	18	61	61
検出率	44.3	27.8	60.7	13.1

図1. 尿中からのデングウイルス遺伝子検出と病日の関係



尿中ウイルス遺伝子は、IgM 抗体が上昇する 4—5 病日以降に検出されることが多い。尿中デングウイルス遺伝子は、血中のウイルス遺伝子が検出できない急性期以降でも検出できる症例があった。

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

日本脳炎ウイルスの病原性を規定する部位同定

研究分担者 倉根一郎（国立感染症研究所ウイルス第一部 部長）
研究協力者 田島 茂（国立感染症研究所ウイルス第一部 主任研究官）
高崎智彦（国立感染症研究所ウイルス第一部第二室 室長）

研究要旨 以前に我々は、2002年以降に当研究室において分離した日本脳炎ウイルス（JEV）5株についてマウス病原性解析を行い、株間で病原性が異なることを明らかにした（Nerome et al. J. Gen. Virol. 88: 2762-2768 (2007)）。今回我々はこの病原性の差異を規定するウイルスゲノム上の部位の同定を試みた。高病原性株 Sw/Mie/40/2004 (Mie40)株と低病原性株 Sw/Mie/41/2002 (Mie41)株の全塩基配列を決定し両者を比較したところ、異なるアミノ酸配列は7ヶ所、異なる非翻訳領域内の塩基配列が6ヶ所認められた。これらのうちどの部位が病原性の差異を規定するかを調べるため、すでに構築済みのMie41株に対する感染性分子クローンをを用いてMie41株とMie40株との組換えキメラウイルスおよび点変異ウイルスを作製し、それらの病原性を解析した。その結果コア蛋白質1ヶ所およびNS4A蛋白質1ヶ所のアミノ酸置換がマウスでの病原性に寄与することが明らかとなった。

A. 研究目的

日本脳炎ウイルス（JEV）の遺伝子型は5型に分類されるが、1990年代以降先島諸島を除く日本国内で主に同定・分離されるJEVの遺伝子型は1型である。国立感染症研究所では2002年以降各地方の衛生研究所の協力の下、ブタ血清からJEVの分離をしているが、これまで分離されたものはすべて1型である。これら分離されたウイルスのうち5株についてマウス病原性解析を行なったところ、同じ1型であるにも関わらず病原性に顕著な差異が観察された。本研究では、すでに我々が確立したJEVリバースジェネティクス法を用い、この病原性の差異を引き起こす要因の同定を試みた。

B. 研究方法

病原性を比較するウイルス株として、高病原性株である Sw/Mie/40/2004 (Mie40)株と、低病原性株 Sw/Mie/41/2002 (Mie41)株を用いた（Nerome et al. J. Gen. Virol. 88: 2762-2768 (2007)）。ウイルスの増殖には Vero (9013)細胞を使用した。JEV 1型に特異的なプライマーを用いて両株の全塩基配列を決定した。Mie40株とMie41株との組換えキメラウイルス作製には、すでに我々が構築した、Mie41株の感染性分子クローンをもちいた。各キメラウイルスの分子クローンよりキメラウイルスRNAを合成後、Vero細胞にトランスフェクトすることにより組換えキ

メラウイルス粒子を得た。各組換えウイルスの感染力価を測定後、力価を揃えて希釈し、マウス (ddY あるいは C3H/He 系統, 3 週齢) の腹腔に接種し、3 週間経過観察した。

(倫理面での配慮等)

本研究における動物実験は、国立感染症研究所動物実験委員会により承認された。遺伝子組換え実験は文部科学大臣の承認を得て行なった (大 18-7)。

C. 研究結果

Mie40 株および Mie41 株の全塩基配列 (共に 10965 ヌクレオチド) を決定した (図 1)。蛋白質コード領域についてはアミノ酸に変換し、両株での差異を調べた。すると計 7 ヶ所のアミノ酸が異なっていた。内訳は構造蛋白質領域が 1 ヶ所 (コア部位、前から 10 番目)、残り 6 ヶ所が非構造蛋白質領域であり、NS3 が 1 ヶ所 (1971 番目)、NS4A が 1 ヶ所 (2126 番目)、NS5 が 4 ヶ所 (2547 番目、2956 番目、3053 番目、3387 番目) であった。また蛋白質コード領域外にある非翻訳領域については塩基配列を比較したところ、5' 側は完全に一致していたが、3' 側は 6 ヶ所が異なっていた。

両者の差異をもとに 4 種類の組換えキメラウイルスクローン NS3-4A (Mie40)/rMie41/pMW119, NS4B-5 (Mie40)/rMie41/pMW119, 3' NTR (Mie40)/rMie41/pMW119, CprME, NS3-3' NTR (Mie40)/rMie41/pMW119 (図 1) を構築し、これから組換えウイルス粒子を得た。これらキメラウイルスおよび Mie40 および Mie41 株をマウス (ddY) の腹腔に接種し病原性を比較した。

NS4B-5 (Mie40) および 3' NTR (Mie40) キメラウイルスでは、Mie41 株と同様低病原性を示したが、NS3-4A (Mie40) および CprM, NS3-3' NTR (Mie40) キメラウイルスは Mie40 株に比較的類似した病原性を示した。類似した結果は C3H/He マウスでも観察された (以降の実験は C3H/He を用いた)。以上より、NS5 領域の 4 ヶ所のアミノ酸置換および 3' NTR の塩基置換は病原性に関与しないことが明らかとなった。次に残り 3 ヶ所のアミノ酸置換について詳細に解析した。各部位の点変異ウイルスを作製し病原性を比較したところ、NS3 での変異は病原性に関与しないことが明らかとなった。一方 C 部位 (10 番目) と NS4A (2126 番目) 部位は各々単独で病原性に関与することが明らかとなった。10 番目の部位は、アミノ酸がリジンの場合高病原性を示しアルギニンの場合は低病原性を示す。また 2126 番目の部位は、バリンの場合は低病原性を示し、イソロイシンでは高病原性を示す (図 2)。

D. 考察

JEV 分子クローンをを用いることにより、JEV の病原性の差異を規定する部位を同定することができた。同定された部位は、以前我々が JEV3 型株である Beijing-1 とのキメラウイルスで同定した病原性規定部位 (E 蛋白質内) とは全く異なっていた。今回決定された部位はこれまでの報告でも全く注目されていない部位であり非常に興味深く、またメカニズムについても容易には想像がつかない。C 蛋白質はウイルス粒子へのウイルスゲノムのパッケージングに関与する構造蛋白質であるが、その他に核内に局在するとの報告がある。これらのことを踏まえ、病原性制

御機構の解析を進めたい。非構造蛋白質であるNS4Aは疎水性アミノ酸を多く含むことから、膜蛋白質と考えられている。ウイルスのライフサイクルでは、主にゲノム複製に関与し、複製複合体の形成に関与するとの報告があるが、その機能解析はウイルス蛋白質の中で最も進んでいないものの1つである。しかし最近NS4Aが宿主側のインターフェロン系のシグナル伝達に影響する可能性が示唆されている。今後この経路に焦点を当てて解析を進めてゆきたい。

E. 結論

JEVのコア蛋白質の1ヶ所(10番目)およびNS4A蛋白質の1ヶ所(2126番目)のアミノ酸置換がマウスでの病原性に寄与することが明らかとなった。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

貫井陽子、田島茂、池田真紀子、小滝徹、加藤文博、根路銘令子、林昌宏、高崎智彦、倉根一郎。日本脳炎ウイルス非構造蛋白質NS4Aの1アミノ酸変異はIFN β の誘導を低下させることにより病原性を高める。第56回日本ウイルス学会学術集会(平成20年10月)

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

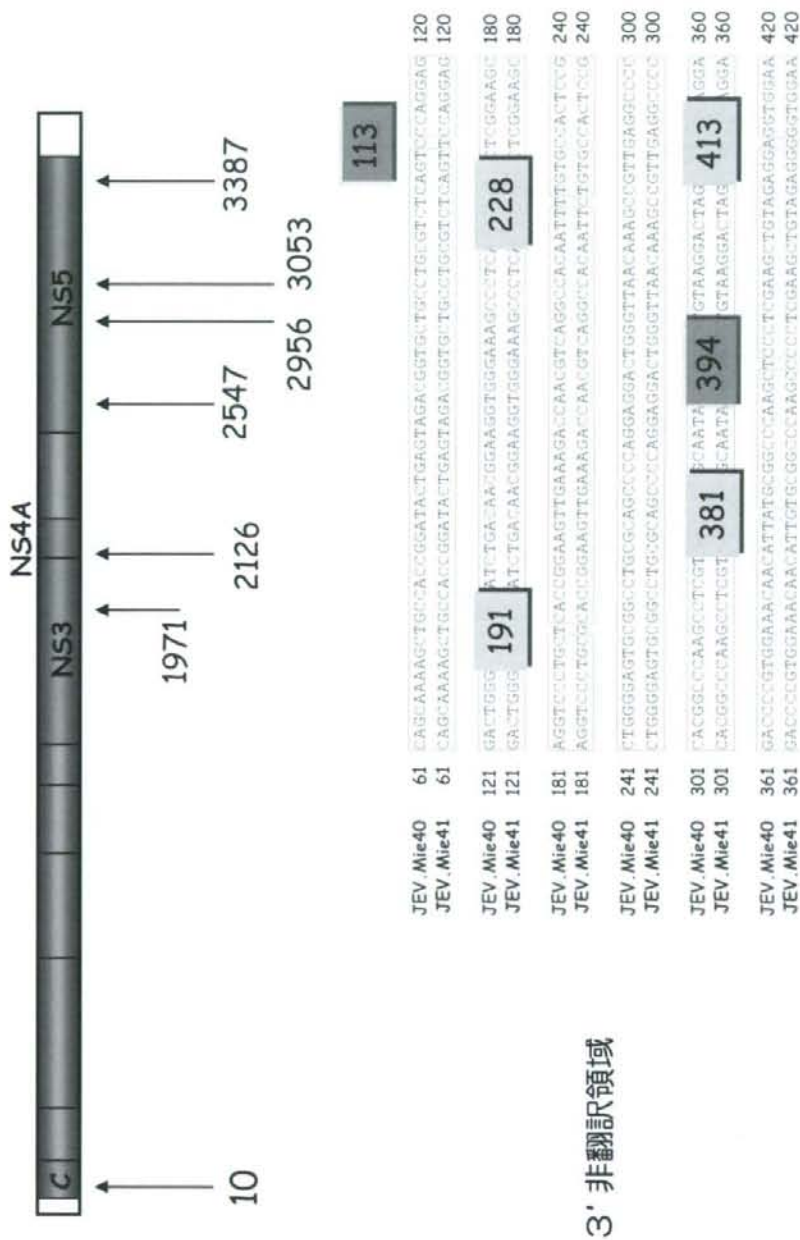
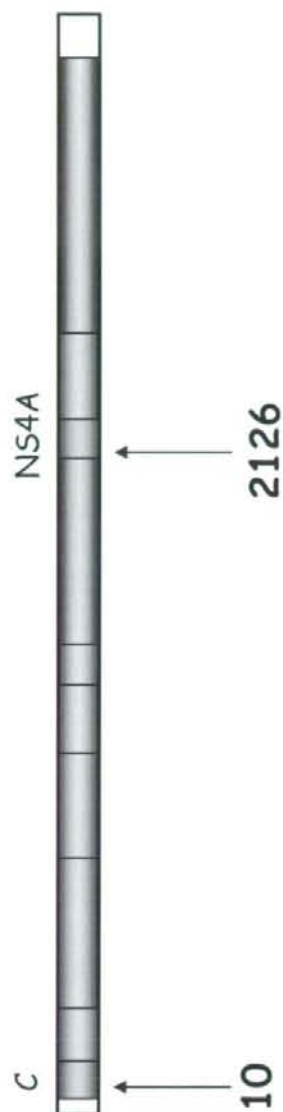


図1 Mie40株とMie41株でアミノ酸配列およびヌクレオチド配列 (非翻訳領域のみ) で差異のある部位



	10 (C)	2126 (NS4A)	Neuroinvasiveness
	R	V	Low
	K	V	High
	R	I	High
	K	I	High

図2 本研究で明らかとなったマウス病原性に関するアミノ酸部位

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

デングウイルス抗原により前免疫したマウスにおけるデング4価DNAワクチンの
中和抗体誘導能の増強及び交差免疫原性の考察

研究分担者 小西英二（神戸大学・准教授）

研究要旨 DNAワクチンは、安全・安価な特徴があり国際的に普及できる感染症予防戦略の一つである。これまで我々は地球規模の蚊媒介性フラビウイルスであるデングウイルス（DENV）、ウエストナイルウイルス（WNV）及び日本脳炎ウイルス（JEV）に対するDNAワクチンを作製し評価してきた。本事業の3年間では、遺伝子組換え製剤に対する人々の懸念を鑑み、DNAワクチンのドーズ低減に焦点を当てた。一昨年度（平成18年度）は、WNV及びJEVモデルを用いて、昨年度は、DENVモデルを用いて、DNAワクチンのドーズが蛋白ワクチンとの混合投与により格段に低減できることを証明した。今年度は、蛋白ワクチンの混合投与によりDNAワクチンのドーズ低減が可能となるメカニズムを、DENVモデルを用いて検討した。デング2型抗原で前免疫した後にデング4価DNAワクチンを接種したマウスに誘導される中和抗体価は前免疫しない場合より高く、その現象は同種（2型）のみならず異種（1型、3型、4型）の免疫原性に対しても認められた。この上昇は中和試験の交差反応のレベルを有意に超えており、交差免疫原性と考えられた。この交差免疫原性は、過去のデータの解析により、デング4価DNAワクチン投与の後に、あるいは同時にデング2型抗原で免疫した場合にも認められた。比較的頻繁に自然暴露を受ける流行地では、デング4価DNAワクチンはより効果的になるため、さらなるドーズ低減が可能と考えられる。

A. 研究目的

4種のデングウイルス（DENV1-4）、ウエストナイルウイルス（WNV）及び日本脳炎ウイルス（JEV）は、地球規模の蚊媒介性病原体である。DENV1-4が引き起こすデング熱・デング出血熱は、熱帯・亜熱帯地域に広く分布し、年間推定約1億人の患者を生ずる。一方、WNVが引き起こすウエストナイル熱は熱帯・亜熱帯のみならず温帯地域に、またJEVが引き起こす日本脳炎はアジアの広い地域に存在する。いずれも分布域は拡大している。わが国

にとって、DENV1-4及びWNVは侵入することが危惧され、またJEVは再興感染症の原因になりうる病原体である。いずれの病気も特異的な治療法はないため、予防が重要である。

感染症の予防にはワクチンが最も普遍的な手段と考えられている。現在、デング熱・デング出血熱やウエストナイル熱に対して認可ワクチンはない。日本脳炎に対しては、わが国が開発した効力の高いワクチンが世界的に認可されているが、高価なため開発途上国に普及させるため

には改良が望まれている。地球規模で蔓延するいわゆる国際感染症に対しては、先進国はもとより開発途上国にも導入可能な戦略でワクチンを開発する必要がある。すなわち安価であり、また人々に容認されうる安全なワクチンである。DNA ワクチンは、国際的視野に立ち病気を予防するために適した感染症予防戦略の一つである。従来のワクチン製造法は疾患により異なるが、遺伝子組換え技術の導入により、疾患非特異的に製造できるようになった。遺伝子組換え技術による新しいワクチンには、ウイルスベクターを用いた組換えウイルスワクチンも考案されているが、自然界の野生株との相同組換えが完全には否定できず、全く新規のウイルスを人類が作り出す危険性に繋がる。それに対して DNA ワクチンは、その危険性はなく、安全な戦略である。

しかしながら、これまで多くの臨床試験が行われてきたものの、ヒト用には未だ認可されたものはない（動物用には2005年米国でウエストナイル DNA ワクチンが認可された）。障害の1つは、遺伝子組換え製剤に対する人々の懸念である。本事業の3年間では、この懸念を鑑み、DNA ワクチンのドーズ低減に焦点を当てた。すなわち初年度（平成18年度）には、WNVのマウスモデルにおいては0.1 µgの1回接種で、また JEV のブタモデルにおいては1 µgの2回接種で中和抗体を誘導できることを証明した。通常のマウスを用いた DNA ワクチンの初期評価には100 µg、一方臨床試験や大動物を対象とした評価には数百 µg から数 mg を複数回投与することと比較すると、格段のドーズ低減である。2年目（平成19年度）には、 Dengue 4 価 DNA ワクチンを用いて、Den-

グ2型蛋白ワクチンの150 ngを混合したときに各型の Dengue DNA ワクチンが5 µgの少量でも中和抗体を全ての型に対して誘導することを示した。

今年度は、DNA ワクチンのドーズ低減が可能となるメカニズムについて、DENV モデルを用いて、より詳しく解析した。すなわち、Dengue 4 価 DNA ワクチンを接種する前に DENV2 抗原で免疫した場合にも、他の型の DENV に対して誘導される中和抗体価の上昇が認められるかどうかを調べた。また、過去のデータも参照して、ワクチンを接種した後に DENV 抗原で免疫した場合、また Dengue 4 価 DNA ワクチンに DENV2 抗原を混合して投与した場合の中和抗体能の上昇と比較した。

B. 研究方法

ウイルス：Dengue 1 型ウイルス (DENV1) 望月株、Dengue 2 型ウイルス (DENV2) ニューギニア C (NGC) 株、Dengue 3 型ウイルス (DENV3) H87 株及び Dengue 4 型ウイルス (DENV4) H241 株を用いた。中和試験の抗原にはそれぞれのウイルスを Vero 細胞に感染して得られた培養液を用いた。また、マウスに前免疫する抗原として NGC 株感染乳呑みマウスの20% 脳乳剤（安定剤として10% 正常マウス血清を含む）を用いた。

DNA ワクチン：Dengue 1 型、2 型、3 型及び4型に対する DNA ワクチン（それぞれ pcD1ME、pcD2ME、pcD3ME 及び pcD4ME）は、昨年度の研究に用いたものと同じである。DNA ワクチンに組み込んだ prM/E 遺伝子は、それぞれ望月株（1 型）、NGC 株（2 型）、H87 株（3 型）及び H241 株（4 型）であった。すべてのプラスミド DNA は、キアゲン DNA 精製キッ

トで精製してマウスに投与した。1型から4型に対するDNAワクチンの混合液をデング4価DNAワクチンとした。ドーズは、各10 μ g(計40 μ g/匹)とし、リン酸緩衝生理食塩水(PBS)で100 μ lに調整して針無注射器を用いて両大腿部に接種した。

マウス実験:4週齢の雄 ddY マウス(1群4~6匹)に、マウス脳乳剤(原液、1:10希釈液あるいは1:100希釈液)の500 μ lを、腹腔内に1回あるいは2週間隔で2回接種した。対照として、PBSの500 μ lを接種した。3~4週間後にデング4価DNAワクチンの初回接種、さらに3~4週間後に追加接種を行った。採血は、眼窩静脈叢から行い、中和抗体価をブール血清で測定した。

中和試験:2倍階段希釈した血清とウイルスの混合液に補体を最終濃度が5%になるように添加し、90%フォーカス減少法で判定した。フォーカス計数は、Vero細胞を感染後3-4日目に固定し、フラビウイルス交差性モノクローナル抗体(D1-4G2)あるいは抗DENV過剰免疫マウス腹水(HMAF)で免疫染色して行った。

(倫理面への配慮)

本研究における動物実験は、神戸大学大学院医学系研究科動物実験委員会により承認された後に実施した。

C. 研究結果

DENV2抗原による前免疫がデング4価DNAワクチンの免疫原性に及ぼす影響:デング4価DNAワクチンを接種する3~4週間前にDENV2感染マウス脳乳剤を投与し、投与しない群と中和抗体価の誘導を比較することにより、前免疫の影響を評価した。最初の実験では、脳乳剤の原液あるいは1:10希釈液を前免疫の免疫原と

して用いた。すなわち、ddYマウスに500 μ lの脳乳剤(原液あるいは1:10希釈液)を投与し、その3週間後にデング4価DNAワクチンを接種した。ワクチン接種後の中和抗体価の経時変化を図1に示す。脳乳剤で前免疫した群では、DENV2に対して1:20~1:40の中和抗体価が接種前(0週目)に認められたが、他の型に対しては検出限界未満(<1:10)であった。デング4価DNAワクチン接種後は、前免疫の免疫原と同種のDENV2に対して1週後に上昇が認められ、さらに異種のDENV1に対しても1週後に、またDENV3及びDENV4に対しても2週後に1:10~1:40までの上昇が認められた。同種のDENV2に対しては、接種前に1:20~1:40の中和抗体価を有していたため、2週後には1:80の抗体価を示した。一方、前免疫を行わなかったマウスにおいては、ワクチン接種後2週目までに検出できる中和抗体価は、全ての型に対して認められなかった。しかし、初回のワクチン接種から4週後に行ったデング4価DNAワクチンによる2回目の接種後は、全ての型に対して、また全ての群において中和抗体価が1週目には上昇した。前免疫した群では対照群と比較すると、同種のDENV2では4~16倍、一方異種のDENV1、DENV3及びDENV4でも2~8倍高い中和抗体価が認められた。

次に、前免疫により誘導される中和抗体価の範囲を広げる目的で、脳乳剤の原液及び1:10希釈液の1回投与に加えて、1:100希釈液の1回投与及び1:10希釈液の2回投与群を設けた。この実験では、脳乳剤の投与後4週目に(2回投与群では2週間隔で投与し、2回目の投与から2週目に)デング4価DNAワクチンを2回接種し、最終接種の2週後に採血して中和抗体価を

調べた (表1)。1:10希釈液の2回投与群において最も高い抗体価が誘導され、対照のPBS接種群で得られた抗体価と比較すると、同種のDENV2において64倍、その他の型においては4~8倍であった。また、原液あるいは1:10希釈液を1回接種した群では、DENV2において16~32倍、その他の型においては2~8倍であった。しかし、1:100希釈液を接種した群では前免疫の効果が低く、DENV2において8倍であったが、その他の型においては2倍以下であった。これらの結果は、ある型に対して既に免疫をある程度有している場合、デング4価DNAワクチンの効果は同じ型のみならず異なる型においても増強されることを示す。

デング4価DNAワクチン接種後にDENV抗原を投与したマウスにおける免疫原性増強の解析：上記の実験は、デング4価DNAワクチン接種前に既に免疫がある場合を想定して実験を行ったが、流行地ではワクチン接種後にある型の感染を受けることも想定される。この場合に同型及び異型のウイルスに対する抗体価がどのように上昇するかを調べるために、以前に報告したデータ (平成16年度厚生科学研究費補助金、新興・再興感染症研究事業「節足動物媒介性ウイルスに対する診断法の確立、疫学及びワクチン開発に関する研究」研究報告書「デング4価DNAワクチンのマウスにおける評価」) を用いて解析した。この実験では、BALB/cマウスに4価DNAワクチン (各25 µg) を3週間隔で2回免疫し、その3週後にDENV1-4抗原のそれぞれを腹腔内に投与した。14日後に得られた各群のプール血清に含まれる、すべての型に対する中和抗体価を測定した (図2A、上のパネル)。

対照として、100 µgの単価DNAワクチンで2回免疫した後、同型のDENV抗原を投与したマウスの血清を用いた (図2A、下のパネル)。

デング4価DNAワクチン接種マウスにおける各型のDENVに対する中和抗体価は、単価DNAワクチン接種マウスにおける抗体価より概ね高く、異型のDENVに対する中和抗体価における増加を示唆した。この増加を数値化して比較するために、まず同型のDENVに対する中和抗体価で標準化した (図2B)。すなわち、DENV2抗原投与マウスでは、4価DNAワクチンを接種したマウスのDENV2に対する抗体価は1:640であるのに対して、単価DNAワクチン接種マウスの抗体価は1:1280であったため、4価DNAワクチン接種マウスの全ての型に対する抗体価を2倍した。同様に、DENV3抗原投与マウスの抗体価は2倍、またDENV4抗原投与マウスの抗体価は4倍した。この時の、4価DNAワクチン接種マウスと単価DNAワクチン接種マウスの抗体価を各型で比較したのが図2Cである。ワクチン接種後に投与したDENV抗原と異なる型に対する中和抗体価の増分を濃い灰色で示す。DENV3あるいはDENV4抗原を追加免疫に用いたマウスにおけるDENV1に対する中和抗体価以外は、4~64倍の上昇を示した。

デング4価DNAワクチンと蛋白ワクチンを同時投与したマウスにおける免疫原性増強の解析：同時投与に関しても、過去に報告したデータ (平成17年度厚生科学研究費補助金、新興・再興感染症研究事業「節足動物媒介性ウイルスに対する診断法の確立、疫学及びワクチン開発に関する研究」研究報告書「タンパクワクチンとの混合投与によるデング4価DNA

ワクチンのマウスにおける中和抗体誘導能の上昇)に基づいて解析を行った。この実験では、ddYマウスに4価DNAワクチン(各25 µg)と1/10ドーズの日本脳炎不活化ワクチン(JEVAX; 図3A)または150 ngのD2EPワクチン(図3B)を混合した接種液を、13週間隔で2回投与した。なおD2EPは、DENV2のprM-E遺伝子をトランスフェクトしたCHO細胞から産生された細胞外粒子である。対照として、4価DNAワクチン単独投与群及び蛋白ワクチン単独投与群を設けた。蛋白ワクチン単独投与群では、検知できる中和抗体価は初回接種後18週目まで認められなかった。

このデータに基づき、蛋白ワクチン同時投与による効果を図3Cに示す。すなわち、同時投与により得られた中和抗体価を、4価DNAワクチン単独投与により得られた中和抗体価で除した値を各型に対して求めた。JEVAXと同時投与したマウスのDENV3に対する18週目のデータ以外は2倍以上を示し、多くの場合4~16倍であった。4価DNAワクチンの産生する抗原と交差性の高いD2EPを蛋白ワクチンとして用いた方が、血清グループの異なる日本脳炎ウイルス抗原(JEVAX)を用いた場合より高い上昇効果を、全ての型に対して示した。また、D2EPを用いた場合、初回免疫後は同種のDENV2に対して大きな増強効果が認められたが、追加免疫後は異種のDENV3やDENV4に対しても認められた。

D. 考 察

我々は、これまでの Dengue 4 価 DNA ワクチンの評価に、Dengue ウイルスに対する抗体を有しないナイーブのマウスを用いてきた。しかし、Dengue 熱の流行地では、

ワクチン接種前に自然暴露を受けている可能性もあり、すでに誘導されたある型の DENV に対する免疫が、どのように Dengue 4 価 DNA ワクチンの免疫原性に影響を及ぼすかを調べる必要がある。Dengue ワクチンにおいては 4 型すべてに対して中和抗体を誘導しなければ感染増強による重症化が懸念されるため、特に中和抗体のバランスが重要である。今回の実験では、DENV2 抗原を投与した 3~4 週後に Dengue 4 価 DNA ワクチンを接種して、前免疫を与えない群と中和抗体価を比較した。その結果、DENV2 に対する前免疫を有しても Dengue 4 価 DNA ワクチンはすべての型に対して中和抗体をバランスよく誘導した。むしろ、前免疫を有しないマウスより、4 型すべてに対して高い中和抗体価が誘導され、前免疫は Dengue 4 価 DNA ワクチンの免疫原性を増強することが示された。

フラビウイルス属の中で、4 種の Dengue ウイルスは Dengue グループに属し、血清学的に交差反応性が高い。しかし、この交差反応性は中和試験においては低く示され、図 1 の 0 週目(ワクチン投与直前)に見られるように、DENV2 に対する中和抗体価が 1:40 であっても、他の型に対しては検知限界未満 (<1:10) である。また、図 2A の単価 DNA ワクチン接種マウスにおける DENV2 に対する中和抗体価に見られるように、同種の過剰免疫血清に対しては 1:1280 であるのに対して、DENV1 に対しては 1:40 (32 分の 1)、DENV3 に対しては 1:80 (16 分の 1)、また DENV4 に対しては 1:10 (128 分の 1) である。このように中和試験は、DENV の型特異抗原エпитオプに対する抗体を検知することに優れる方法であり、前免疫による Dengue 4 価 DNA

ワクチンの免疫原性増強を解析可能にする。

図1の6週目に見られるように、脳乳剤原液で前免疫したマウスにデング4価DNAワクチンを接種した後のDENV1に対する中和抗体価(1:320)は、DENV2に対する抗体価(1:640)の交差反応(32分の1であるので1:20)を前免疫しないマウスで得られた抗体価(1:80)に加算して得られる抗体価(1:100)の約3倍である。言い換えれば、DENV1に対する1:320は、DENV2に対する抗体の交差反応性を捉えたものではなく、DENV1に対するDNAワクチンを投与したときに存在したDENV2に対する免疫が、抗原交差的にDENV1に対する特異免疫誘導に影響したものと考えられる。我々は、これを交差反応性と区別して「交差免疫原性」と称した。この交差免疫原性は、他の型においても認められ、DENV3に対する抗体価(1:640)はDENV2に対する抗体価の交差反応(16分の1であるので1:40)と前免疫しない場合の抗体価(1:160)の合計(1:200)の約3倍であり、またDENV4に対する抗体価(1:160)はDENV2に対する抗体価の交差反応(128分の1であるので1:5)と前免疫しない場合の抗体価(1:40)の合計(1:45)の約4倍である。

DENVの全ての型に対するDNAワクチン(4価DNAワクチン)とある1つの型の抗原(DENV2抗原)の投与により、異なる型に対する中和抗体が上昇する効果は、投与のタイミングが異なっても認められる。すなわち、4価DNAワクチンの接種前だけでなく、過去のデータ(図2、3)から、ワクチン接種後においても、また同時投与においても示された。用いたDENV2抗原の量やマウス系統が異なるた

め正確な比較はできないが、いずれの条件でも対照群から概ね4~16倍の上昇であった。したがって、デング4価DNAワクチンを接種した個体が、ある1つの型の抗原による免疫をタイミングに関わらず受けた場合に見られる交差免疫原性が、デング4価DNAワクチンのドーズを低減できたメカニズムの1つと考えられる。交差免疫原性の詳細な機序は不明であるが、4種のDENV間における免疫レベルでの分子類似性に基づくものと思われる。交差免疫原性により、自然暴露を比較的頻繁に受ける流行地では、デング4価DNAワクチンの効果はさらに高くなり、これに伴うドーズ低減が可能になると考えられた。

E. 結論

デング4価DNAワクチンの効果は、DENV抗原を同時にまたはワクチン接種前後に投与しても各型に対してバランスよく増強された。メカニズムとして交差免疫原性が考えられた。

G. 研究発表

1. 論文発表

Tomohiro Ishikawa, Douglas G. Widman, Nigel Bourne, Eiji Konishi, Peter W. Mason: Construction and evaluation of a chimeric pseudoinfectious virus vaccine to prevent Japanese encephalitis. *Vaccine* 26, 2772-2781, 2008.

Teiichi Matsunaga, Mizue Shoda, Eiji Konishi: Japanese encephalitis remains common in Japan. *Pediatric Infectious Disease Journal* 27, 769-770, 2008.

Eiji Konishi, Kyoko Yagawa, Atsushi

Yamanaka: Vero Cells Infected with Vaccinia Viruses Expressing Japanese Encephalitis Virus Envelope Protein Induce Polykaryocyte Formation under Neutral Conditions. Japanese Journal of Infectious Diseases 61, 410-411, 2008.

小西英二. 日本脳炎ワクチンに関する最近の話題. 臨床と微生物, 36(1): 41-44, 2009.

小西英二. 日本脳炎DNAワクチンの開発. 臨床獣医, 27, 2009 (印刷中).

2. 学会発表

Atsushi Yamanaka, Saori Kosugi, Eiji Konishi: Antibody-dependent enhancement of dengue virus infection controlled by complement levels. The 42nd Joint Viral Diseases Panel Meeting US-Japan Collaborative Medical Sciences Program. May, 2008

山中敦史、酒井陽平、小西英二: インドネシアのジャワ島住民における日本脳炎ウイルス抗体保有状況. 第43回日本脳炎ウイルス生態学研究会. 2008年5月

北井陽子、近藤高志、小西英二: ウエストナイルウイルス感染を鑑別する補体利用の抗体測定法. 第43回日本脳炎ウイルス生態学研究会. 2008年5月

Atsushi Yamanaka, Yohei Sakai, Eiji Konishi: High prevalence of antibodies to Japanese encephalitis virus among inhabitants in Java Island, Indonesia, relative to a small pig population. The Forum of the Network of Research Centers on Infectious

Diseases Conference. Hanoi, Vietnam, October, 2008

北井陽子、白藤浩明、金平克史、神尾次彦、近藤高志、小西英二: 日本脳炎ワクチン接種後にウエストナイルウイルス(WNV)を実験感染したウマ血清中のWNV特異NS1抗体測定: プロッキングELISA法とCDC法の評価. 第15回トガ・フラビ・ペスチウイルス研究会. 2008年10月

宮川優子、山中敦史、小西英二: デング2型ウイルスを用いたマウスモデルにおける中和抗体のウイルス血症防御能. 第56回日本ウイルス学会学術集会. 2008年10月

北井陽子、近藤高志、小西英二: 補体を利用したウマ血清中ウエストナイルウイルス特異的NS1抗体の測定. 第56回日本ウイルス学会学術集会. 2008年10月

桑原三和、小西英二: 日本脳炎ワクチン抗原を連続産生する昆虫細胞株の樹立. 第12回日本ワクチン学会学術集会. 2008年11月

Atsushi Yamanaka, Soengeng Soegijanto, Fedik A. Rantam, Eiji Konishi: A simple method for evaluating dengue vaccine effectiveness using mice. Asian-African Research Forum on Emerging and Reemerging Infections-2008, Hokkaido, Japan, December 2008

Atsushi Yamanaka, Soengeng Soegijanto, Fedik A. Rantam, Aryati, Puspa Wardhani,

Helen Susilowati, Eryk Hendrianto, Eiji Konishi: Complement levels control enhancing and neutralizing activities of mouse monoclonal antibodies against dengue viruses. Asian-African Research Forum on Emerging and Reemerging Infections-2008, Hokkaido, Japan, December 2008

Peter W. Mason, Douglas Widman, Tomohiro Ishikawa, Nigel Bourne, Ryosuke Suzuki, Evandro Winkelmann, Ilya Frolov, Ricardo Carrion, Eiji Konishi: Engineering third-generation vaccines for West Nile encephalitis, Japanese encephalitis, and dengue. The 1st Pan-American Dengue Research Network Meeting. Recife, Brazil, January 2009

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

該当なし。

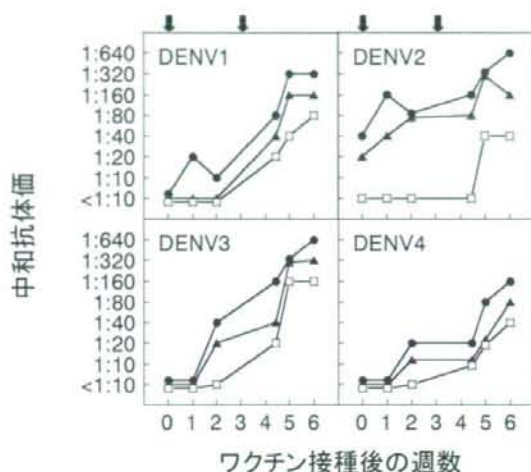


図1. DENV2抗原により前免疫したマウスにおけるデング4価DNAワクチン接種後の中和抗体価の経時変化。4週齢の雄ddYマウスに、DENV2感染マウス脳乳剤の原液(●)あるいは1:10希釈液(▲)、また対照としてPBS(□)の500 μ l量を腹腔内に投与し、その4週間後にデング4価DNAワクチン(各型につき10 μ g)を大腿部に接種した。さらにその4週間後に同ドーズのデング4価DNAワクチンを追加接種した。横軸は、ワクチンの初回接種後の週数を表す。0週目は、ワクチン接種直前を示す。縦軸は、各型のDENVに対する中和抗体価を表す。矢印はワクチン接種の時期を示す。

表1. DENV2抗原による前免疫がデング4価DNAワクチンの中和抗体誘導能に及ぼす影響

前免疫*	中和抗体価**			
	DENV1	DENV2	DENV3	DENV4
原液の1回投与	1:160	1:320	1:160	1:160
1:10希釈液の1回投与	1:160	1:160	1:80	1:80
1:10希釈液の2回投与	1:320	1:640	1:160	1:160
1:100希釈液の1回投与	1:80	1:80	1:80	1:20
PBS投与	1:40	1:10	1:40	1:20

* DENV2感染マウス脳乳剤あるいは対照としてPBSを、1群6匹のddYマウス(4週齢雄)に投与した。2回投与群では、2週間隔で投与した。

**脳乳剤の(初回)投与後4週目にデング4価DNAワクチン(各型につき10 μ g)を3週間隔で2回接種し、2回目の接種から2週後に採血して、プール血清中の中和抗体価を調べた。

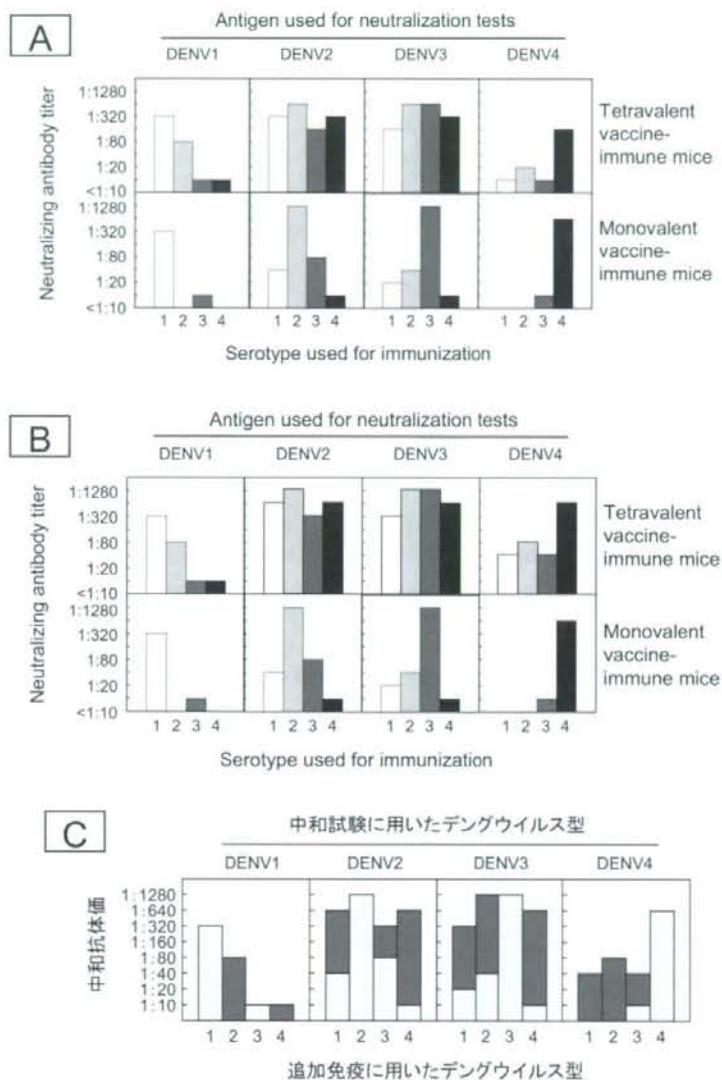


図2. デング4価DNAワクチン接種後にDENV抗原を投与したマウスにおける免疫原性の増強。(A) 4週齢の雄BALB/cマウス(1群6匹)に4価DNAワクチン(各25 μ g, 計100 μ g/匹)を3週間隔で2回投与した。2回目の免疫から3週後にDENV1-4抗原(感染マウス脳乳剤)のいずれかを腹腔内に投与した。その14日後のプール血清における中和抗体価を上のパネルに示す。対照として、100 μ gの単価DNAワクチンで2回免疫した後、同型のDENV抗原を投与したマウスにおける中和抗体価を下のパネルに示す(平成16年度厚生科学研究費補助金、新興・再興感染症研究事業「節足動物媒介性ウイルスに対する診断法の確立、疫学及びワクチン開発に関する研究」研究報告書129ページより転載)。(B) Aにおける4価及び単価DNAワクチン接種群間の中和抗体価を比較するために、ワクチン接種後に投与した抗原と同型のDENVに対する中和抗体価で標準化した。(C) Bにおける4価及び単価DNAワクチン接種群間の中和抗体価の差異を濃い灰色で示した。

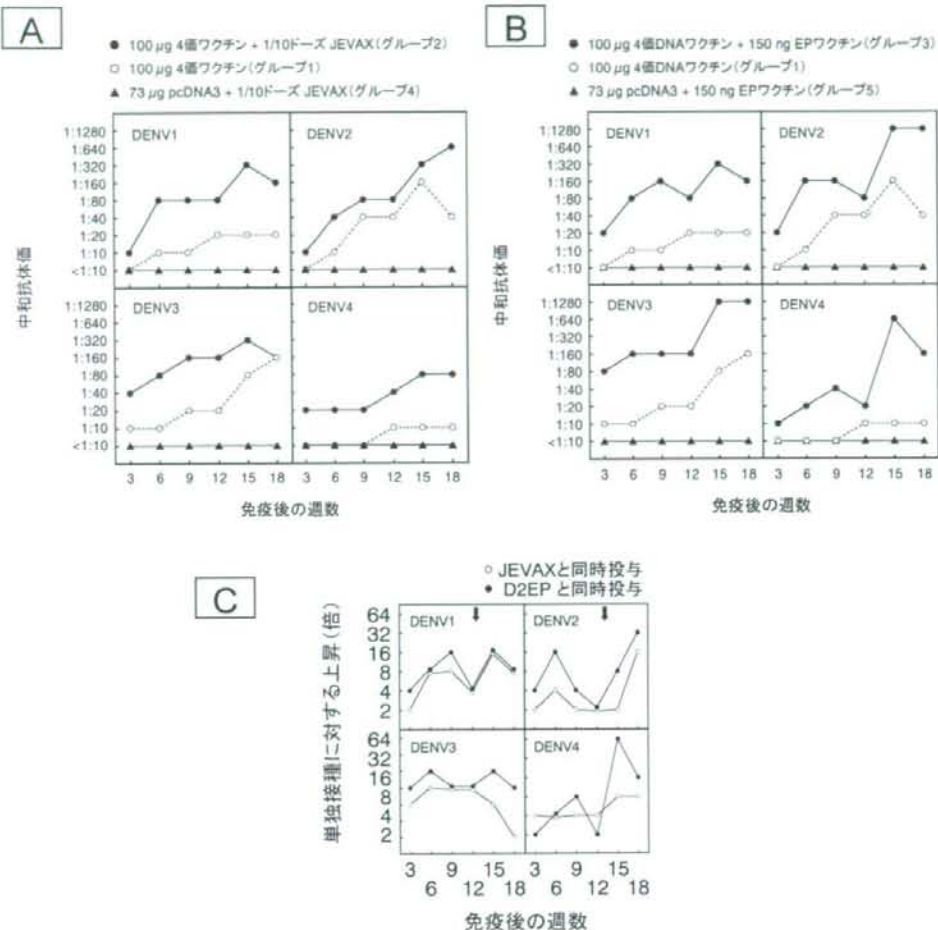


図3. デング4価DNAワクチンと蛋白ワクチンを同時投与したマウスにおける免疫原性の増強。4週令の雄ddYマウス(1群6匹)に4価DNAワクチン(各25 μ g, 計100 μ g/匹)と蛋白ワクチンを混合した接種液を投与した。対照として、4価DNAワクチンあるいは蛋白ワクチンを単独で投与した。ただし、蛋白ワクチン単独投与群には、4価DNAワクチンに含まれると等しいモル数のCpGアジュバント配列が含まれるように、73 μ gのpcDNA3ベクターを加えた。3週間隔で採血し、プール血清中のデング1-4型に対する中和抗体価をそれぞれ測定した。13週後に、同ドーズのワクチンで追加免疫し、18週まで採血した。(A) 蛋白ワクチンとして、1/10ドーズのJEVAXを用いた。(B) 蛋白ワクチンとして、150 ngのD2EPワクチンを用いた(A、B共に平成17年度厚生科学研究費補助金、新興・再興感染症研究事業「節足動物媒介性ウイルスに対する診断法の確立、疫学及びワクチン開発に関する研究」研究報告書76-77ページより転載)。なおD2EPは、DENV2のprM-E遺伝子をトランスフェクトしたCHO細胞から産生された細胞外粒子である。また、4価DNAワクチン単独投与群のデータはAとBで同じである。(C) 4価DNAワクチン単独投与群の中和抗体価に対するDNA/蛋白同時投与群の中和抗体価の倍数。検知未満の中和抗体価(<math><1:10</math>)を1:5として計算した。矢印はワクチン追加接種の時期を示す。

デングウイルス感染の抗体検査に関する研究

デング IgA 抗体検出の有用性

研究分担者	名和 優	埼玉医科大学 医学部 微生物学 講師
研究協力者	町田早苗	埼玉医科大学 医学部 医学研究センター
	高崎智彦	国立感染症研究所 ウイルス第1部 室長
	田島 茂	国立感染症研究所 ウイルス第1部
	倉根一郎	国立感染症研究所 ウイルス第1部 部長
	水野泰孝	国立国際医療センター
	加藤康幸	国立国際医療センター

研究要旨 節足動物媒介性ウイルスの中で熱帯・亜熱帯地域特に東南アジア、中南米で大流行を起こしているデングウイルス感染の危険にさらされる日本人は多い。デングウイルス感染者は世界中で年間1億人を越し、その中で約50万人が出血熱を起こす。デングウイルス診断は通常急性期の血液からのウイルスRNAの検出と特異的IgM抗体の検出で行われるが、出血傾向の強い患者からの採血が困難な場合がある。我々は、抗デングIgA抗体がIgM抗体よりも感染後の消失も早く感染の指標になることを報告し、平成18年度の当研究班での研究で日本人輸入デング患者の尿中からのIgA抗体が検出され痛みを伴わない抗体検出の可能性を示唆している。今回、更に症例数を重ね病日を追った尿と唾液を解析し、尿中だけでなく、唾液からも抗デングIgA抗体を検出し、出血熱で採血できない患者の抗体診断の可能性を示した。

A. 研究目的

節足動物媒介性新興ウイルス感染症の中でワクチン、治療法がないデングウイルス感染症は、熱帯・亜熱帯地域で大きな流行が毎年報告されている。日本では熱帯・および亜熱帯地域からの帰国者の輸入感染例が問題となっている。デングウイルス感染症の診断は、発熱後5日間程度の急性期では血清中よりデングウイルスRNAを検出して確定診断する。それ以後の回復期では血清中の特異的IgM抗体検出と特異的IgA抗体検出で診断可能である。デングウイルス感染症で出血傾向の強い出血熱の場合には血清採取が困難であり、血清以

外のサンプルでの診断が望まれる。我々はかつて日本人輸入感染例での尿中のデング特異IgA抗体を検出し、その診断の可能性を示唆してきた。今回、更に症例を増やし、また尿以外のサンプル、唾液中のIgA抗体を検出したので報告する。

B. 研究方法

1. 検査材料

対象は、いずれもデング流行地域への滞在後国内にてデング感染症と診断された全8症例を解析した。8症例の感染したデングの型は、1型デング:1症例、2型デング:1症例、3型デ

ング:1症例、4型デング:2症例であった。4症例からは経時的に尿及び唾液を採取でき、残りの4症例は尿のみ経時的提出された。尿22検体(8症例)、唾液8検体(4症例)を用いた。

2. 方法

IgA抗体検出法は、平成16年度新興・再興感染症研究事業「デング血清診断におけるIgA抗体検出と有用性の検討」に報告したIgA抗体捕捉酵素免疫吸着測定法(IgA-ELISA)を応用した。検出法は、抗ヒトIgA抗体を捕捉抗体として96穴プレートに4℃、一晚(あるいは37℃、1時間)コートし、PBS-Tween 20にてプレートを3回洗浄し、ブロックエースで室温、1時間ブロッキングした。プレートを3回洗浄し、希釈液として10%ブロックエース PBS-Tween 20を用いて尿および唾液を8倍希釈し、37℃、1時間反応させた。次にデングウイルス4価抗原、非感染コントロール抗原および日本脳炎ウイルス抗原をのせ4℃、一晚反応し、洗浄後、酵素標識フラビ特異的モノクローナル抗体で反応させ、酵素発色させた。抗体陽性と陰性の判定は、ウイルス抗原で得られた吸光度(P)および非感染コントロールでの吸光度(N)との比(P/N ratio)2.0以上を抗体陽性とした。

【倫理面についての配慮】

本研究で用いた臨床材料の採取は、「疫学研究における倫理指針」に基づき、平成18年5月30日に国立感染症研究所医学研究倫理審査に申請・登録され、同意を得て採取された。材料提供者および家族の個人の尊厳及び人権の尊重、個人情報の保護に配慮して実施した。

C. 研究結果

1. デング患者より尿中IgA抗体の検出

尿中の抗デングIgA抗体とデングウイルスとの交差反応性を示す日本脳炎ウイルス(JE)に対するIgA抗体の吸光度をP/N ratioで示

し、8倍希釈で2.0以上を陽性とした。尿中で抗デングIgA抗体陽性と判定された症例は、8症例中4症例であった。抗デングIgA抗体が検出された検体の病日は、5病日、6病日、7病日、8病日であった。1病日、3病日、4病日では抗デングIgA抗体は検出されなかった。

図1-1の症例は3型のデング患者からのIgA抗体検出例を示した。IgA抗体は、5病日と7病日で陽性となったが、3病日と12病日では陰性であった。一方、JEの抗体は各病日も検出されなかった。

図1-2の症例は1型デング感染例で7病日では陰性であったが、9病日でIgA抗体が陽性となった。

2. 唾液中に抗デングIgA抗体が検出された症例

唾液を採取できた4症例中2症例で抗デングIgA抗体が陽性となった。抗デングIgA抗体陽性となった検体の病日は5病日、6病日、8病日であった。

図2は、デング4型感染例で5病日に唾液中の抗デングIgA抗体が検出された例である。この症例は3病日、9病日、11病日の尿も解析したが、いずれもIgA抗体は検出されなかった。唾液中のIgA抗体が検出された5病日は採取できなく、検討できなかった。

3. 唾液および尿中IgA抗体が検出されたデング4型症例(図3-1、3-2)

唾液中の抗デングIgA抗体と抗JE IgA抗体のP/N ratioを図3-1、3-2示した。唾液中には6病日と8病日に抗デングIgA抗体が陽性となり、尿中では8病日のみに抗デングIgA抗体が陽性であった。唾液中および尿中のJEのIgA抗体は低値であった。

D. 考察

デングウイルス感染症の診断において回復

期では血清中の特異的 IgM 抗体検出と特異的 IgA 抗体検出で診断される。デングウイルス感染症で出血傾向の強い出血熱の場合には血清採取が困難であり、血清以外のサンプルでの診断が望まれる。流行地では小児の感染が多く、採血が困難な場合があることなどから、検体採取が容易な尿からの抗デング IgA 抗体での診断の可能性を示唆してきた。

今回の研究では交差反応が懸念される抗 JE IgA 抗体を同時に検出することによって尿中と唾液中のデング特異的 IgA 抗体を検出した。尿中では 8 症例中 4 症例が陽性となり、唾液中では 4 症例中 2 症例で陽性となった。4 型感染の 1 症例では唾液及び尿中から抗デング IgA 抗体が検出された。IgA 抗体が検出された病日は尿中と唾液中で 5 病日以降であり、これは血清中の IgA 抗体の動向と同様で回復期の尿や唾液でも診断の可能性が示唆された。また、我々の血清 IgA 抗体の検出結果では、回復期の IgA 抗体は IgM 抗体より消失が早く感染の指標になり得ることを示唆してきた。尿中の IgA 抗体は 7 病日では検出されるが 12 病日では低下する結果となり(図 1-1)、唾液中でも 5 病日では検出され、9 病日、11 病日では陰性となった(図 2)。尿中、唾液中の IgA 抗体も感染様態を反映している可能性が示唆された。

E. 結論

出血傾向が強く、採血が困難で血清学的診断が施行できない場合に尿中の IgA 抗体を検出することで診断できる可能性を示唆した。また、唾液からも特異的 IgA 抗体を検出できた。小児など採血できない場合、唾液での診断の可能性を示唆した。

F. 健康危機情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

準備中

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし