

の核酸配列と比べ T2, 053C (F→L) および A6, 164 (E→G)、T9188G の 3 つの変異が認められた。

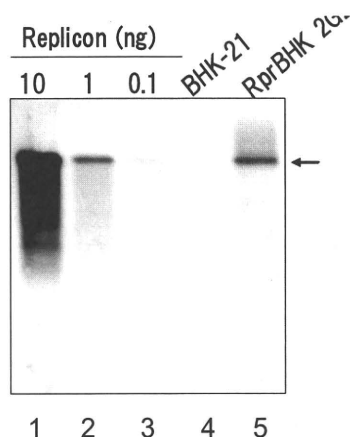


図 1. RprBHK-2G2 細胞内で持続的に複製するレプリコンの解析

BHK-21 (lane 4) および RprBHK-2G2 (lane 5) 細胞より細胞内全 RNA を抽出し、各 2 μg RNA をノーザンブロット解析に供した。サイズおよび量的のマーカとして、in vitro で合成したレプリコン 10 (lane 1)、1 (lane 2) および 0.1 ng (lane 3) を同様に泳動した。泳動後、RNA をナイロン膜にプロットし、DsRed2 遺伝子の核酸をプローブとしてノーザンブロット解析した。矢印はレプリコンを示す。

次に RprBHK-2G2 細胞内で持続的に複製するレプリコンの蛋白質を各種のウイルス蛋白質に対する抗体を用いてウエスタンブロット解析した (図 2)。

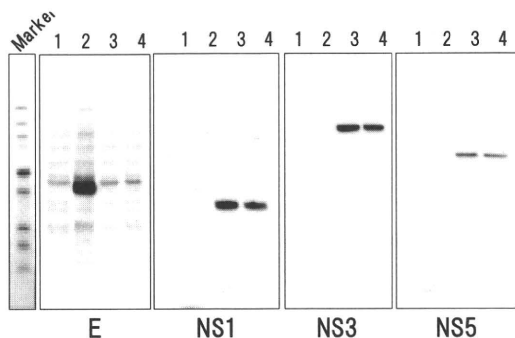


図 2. RprBHK-2G2 細胞内で持続的に複製するレプリコン蛋白質の解析

BHK-21 細胞 (lane 1) および prM/E 発現 BHK-21 細胞 (lane 2)、レプリコン一過性発現 BHK-21 細胞 (lane 3)、RprBHK-2G2 細胞 (lane 4) より蛋白質を抽出し、WNV の E および NS1、NS3、NS5 蛋白質 (図の下に記す) に対する抗体を用いてウエスタンブロット解析した。

レプリコンのみを発現する (構造蛋白質を発現しない) 細胞では、E 蛋白質の発現は認められなかった (抗 E 蛋白質抗体との反応)。レプリコンを一過性に発現させた細胞におけるレプリコン蛋白質と RprBHK-2G2 細胞内で持続的に複製するレプリコン蛋白質では、それらのサイズに差は認められなかった (レプリコン蛋白質のプロセッシングに差は認められない)。

## (2) レプリコン持続複製細胞を用いた VLP 作製

次にレプリコン持続複製細胞

(RprBHK-2G2) に C および prM/E 蛋白質発現ベクターを導入することによる VLP の作製を試みた (図 3A)。VLP の通常的な作成法 (BHK-21 細胞にレプリコンと C、prM/E 蛋白質の発現ベクターを共発現する) と比較して、等量の VLP の産生が認められた (図 3B)。

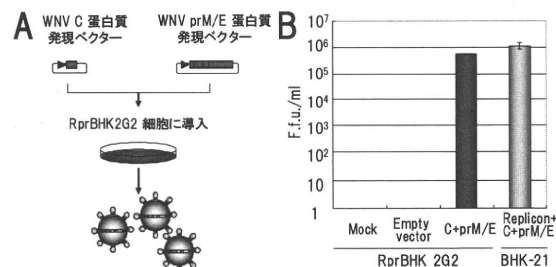


図 3. レプリコン持続複製細胞を用いた VLP の作製

レプリコン持続複製細胞 (RprBHK-2G2) を用いた VLP の作製法を記す (A)。RprBHK-2G2 細胞に WNV の C および prM/E 発現ベクターを導入することにより VLP の作製を行う。本法による VLP の産生量 (赤棒) と通常法による産生量 (青棒) を比較した。

## D. 考察

VLP 作製の通常法 (図 4A) と今回確立した簡易法 (図 4B) の模式図を図 4 に示す。通常法では、第一段階としてレプリコン cDNA (Replicon plasmid) を鋳型として用いて in vitro 転写によりレプリコンを作製する。次にレプリコンと 2 つのウイルス構造蛋白質 (C および prM/E) 発現ベクターを一つの細胞に共発現する必要がある (図 4A)。一方、簡易法ではレプリコン持続複製細胞 (RprBHK-2G2) に C と prM/E 蛋白質の発現

ベクターを導入することで VLP 作製が可能であり、非常に簡易である。本法を用いることにより、昨年度開発したフラビウイルスの VLP 中和試験法で使用する VLP を容易に提供できるものと考えられる。

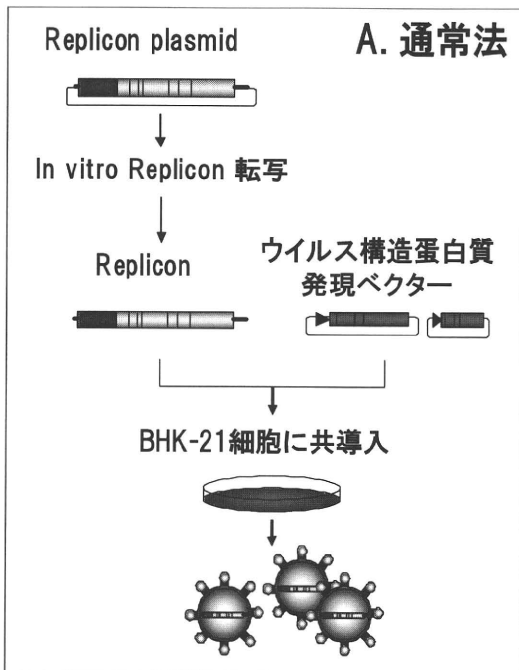


図 4A. フラビウイルスの VLP 作製の通常法

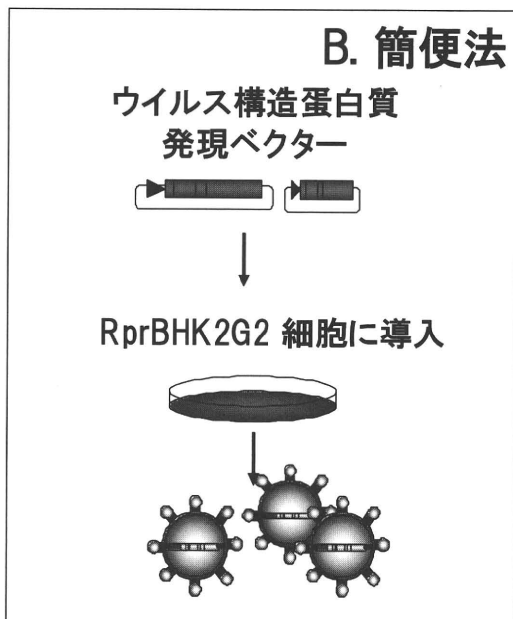


図 4B. フラビウイルスの VLP 作製の簡易法

## E. 結論

昨年度、開発した VLP 中和試験に使用する VLP の簡易作製法の開発に成功した。本法を用いることで、VLP をより簡便に作製できるため、汎用性が増すものと考えられる。

## F. 健康危険情報

特になし。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

(1) Murata, R., Eshita, Y., Maeda, A., Maeda, J., Sakai, A., Tanaka, T., Yoshii, K., Kariwa, H., Umemura, T., and Takashima, I. Glycosylation of West Nile virus envelope protein increases In vivo and In vitro viral multiplication in birds. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 82; 696-704, 2010

(2) Hasebe, R., Suzuki, T., Makinno, Y., Igarashi, M., Yamanouchi, S., Maeda, A., Horiuchi, M., Sawa, H., and Kimura, T. Transcellular transport of West Nile virus-like particles across human endothelial cells depends on residues 156 and 159 of envelope protein. *BMC Microbiol.*, 10; 165-164., 2010

(3) Moritoh, K., Maeda, A., Sasaki, N., and Agui, T. Development and application of West Nile virus subgenomic replicon RNA expressing secreted alkaline phosphatase. *J. Vet. Med. Sci.*, In press, 2010

### 2. 学会発表

(1) 前田秋彦、染谷梓、西野佳以、村田英雄、倉根一郎。ウエストナイルウイルス・レプリコンの持続的複製細胞株の樹立。トガ・フラビ・ペスチウイルス研究会 (2010.12.10, 東京)

(2) Maeda, A., and Ke, Chang-Wen. Epidemiological study of mosquito-borne diseases in Guangdong province, China. The Workshop of Network Laboratories on

Emergency Response and Surveillance of Infectious Diseases in Pan Pearl River Delta Region (2010.12.12, Guangzhou, China)

特になし。

2. 実用新案登録  
特になし。

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

3. その他  
特になし。

1. 特許取得

厚生労働科学研究費補助金（新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業）  
地球温暖化に伴い変化する感染症に対する早期防御法確立に関する研究

分担研究報告書

ウエストナイルウイルス感染マウス脳内浸潤 T 細胞における  
TCR レパトア解析によるウイルス特異性に関する研究

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  
研究協力者 藤井 克樹 国立感染症研究所ウイルス第一部  
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： 地球環境の変化によりその拡大が懸念されるウエストナイルウイルス（WNV）感染症について、本研究ではこれまでに WNV 感染マウスモデルにおいて、脳内浸潤 T 細胞の免疫学的性状解析、またウイルス特異性の解析を通して、WNV、日本脳炎ウイルス、ダニ媒介性脳炎ウイルス間で、脳内浸潤 T 細胞がクローンレベルで異なることを証明してきた。本年度は、これらウイルス特異的 T 細胞が、近縁ウイルス間の感作によって交差反応を示すかどうかについて検討した。その結果、分離した WNV 脳内浸潤 T 細胞は、他の近縁ウイルスとの交差反応は認められなかった。したがって T 細胞による各フラビウイルス抗原の認識において、近縁ウイルス間で共通部位の抗原性が非常に低く、ウイルス特異的であることが証明された。本研究によって得られた知見は、WNV 特異的 T 細胞の抗原特異性における新規情報を示すだけでなく、ワクチン開発における基礎的知見を提供することができると考えられた。

A. 研究目的

地球温暖化に伴って感染症媒介昆虫の生息域が拡大することは、結果的に本邦への感染症侵入を許すことにつながる。感染症のうちウエストナイルウイルス（WNV）は、蚊の吸血によりヒトへ感染し、致死的な脳炎などの疾病を起こすことがある。ヒト用ワクチンが未だ存在せず、脳炎発症のメカニズムも不明なままであり、ワクチン開発および病態解明は急務である。

昨年度の研究成果として、同じフラビウイルス属に含まれるウイルスである WNV、日本脳炎ウイルス（JEV）、ダニ媒介性脳炎ウイルス感染によって誘導されるマウス脳内浸潤 T 細胞が、それぞれ特定の TCRV 遺伝子をもち、抗原特異的 T 細胞であることを解明した。

一方、WNV と JEV のアミノ酸配列の相同性は高く、本邦に存在する JEV 不活化ワクチンの接種により、マウスにおいて WNV 感染マウスの致死率をわずかに減少させるという報告がある。

したがって本年度は、これら各フラビウイルス特異的 T 細胞が、他の近縁ウイルスによる感作で活性化されるか、交差反応を示すかどうかについて検討した。この検討は、T 細胞がウ

イルス間における共通エピトープを認識する可能性を見極めるものであり、ワクチン開発の基礎的情報として有用性が高い。

B. 研究方法

(1) 動物感染実験：WNV は NY99-6922 株、JEV は JaTH160 株を使用し、7 週雌 C3H/HeNjcl (H-2<sup>k</sup>) マウスに感染させた。

(2) 交差反応性の解析：WNV および JEV 感染マウス脳内浸潤 T 細胞を分離し、*in vitro* におけるそれぞれのウイルスに対する交差性を評価するために、感染腹腔細胞との共培養による IFN- $\gamma$  産生能を解析した。さらに共培養後の T 細胞について、クローナリティーの変化を解析した。

(倫理面への配慮)

動物実験は、国立感染症研究所および国立病院機構相模原病院 臨床研究センターにおける実験動物委員会のガイドラインにしたがって実施した。

C. 研究結果

(1) WNV 脳内浸潤 T 細胞と WNV 感染腹腔細胞の共培養系で IFN- $\gamma$  産生誘導を確認した

が、JEV 感染腹腔細胞との共培養では有意な産生は認められなかった (表-1)。

(2) WNV 感染腹腔細胞との共培養により、WNV 脳内浸潤 T 細胞のクローナリティーは亢進し、限られた TCR クローンで占められるようになった (表-2)。

#### D. 考察

*in vitro* における T 細胞による IFN- $\gamma$  誘導能を指標にした交差性の検討により、WNV と JEV の間で交差性は全く認められなかった。このことから WNV 初回感染時では、MHC によって提示されるウイルス関連ペプチドにより選択されて脳内に浸潤する T 細胞は、他の近縁なウイルス間で交差性を示さないことが証明された。これはワクチンを設計するうえで、JEV および WNV の共通エプトープを用いた場合、初回感染における免疫賦活効果が弱い可能性を示唆している。

WNV 感染マウス脳内浸潤 T 細胞の WNV 感染腹腔細胞との共培養によるクローナリティーの亢進は、その T 細胞が WNV 特異的であり、再刺激によって特異性が増強されたことを示唆する。したがって初回感染時の WNV 感染マウス脳内に浸潤する T 細胞は、他の血清学的に類似するフラビウイルスと交差することなく、ウイルス特異的であることが証明された。

#### E. 結論

本研究により、初回感染時に誘導される T 細胞が他のウイルス感染細胞によって活性化されないことを証明した。

これはウイルス間の共通配列部位では免疫系を強く刺激することができないことを示しているので、免疫賦活効率の良いワクチンを作製するためには、配列の異なる部位で検討する方が良いことが考えられた。

#### F. 健康危険情報

特記事項なし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Kitaura K, Kanayama K, Fujii Y, Shiobara N, Tanaka K, Kurane I, Suzuki S, Itoh T, Suzuki R. : T cell receptor repertoire in BALB/c mice varies according to tissue type, sex, age, and hydrocortisone treatment.

Exp Anim. 2009 Apr;58(2):159-68.

Hayasaka D, Nagata N, Fujii Y, Hasegawa H, Sata T, Suzuki R, Gould EA, Takashima I, Koike S. : Mortality following peripheral infection with tick-borne encephalitis virus results from a combination of central nervous system pathology, systemic inflammatory and stress responses.

Virology. 2009 Jul 20;390(1):139-50.

##### 2. 学会発表

北浦一孝、藤井克樹、早坂大輔、高島郁夫、高崎智彦、鈴木隆二、倉根一郎 : ダニ媒介性脳炎ウイルス感染マウスにおける脳炎発症に関わる脳内浸潤 T 細胞の解析 第 57 回日本ウイルス学会学術集会 (東京) 2009 年 10 月 25-27 日

#### 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

なし。

表 1. WNV および JEV 感染マウス脳分離 T 細胞を WNV および JEV 感染細胞と共培養した後の IFN- $\gamma$  産生量

PEC isolated from	Virus infection	IFN- $\gamma$ production (pg/mL)	
		T-cells isolated from	
		WNV-infected C3H/HeN mice brain	JEV-infected C3H/HeN mice brain
C3H/HeN <sup>Jcl</sup> (H-2 <sup>b</sup> )	WNV	1446.6 $\pm$ 55.5*	20.3 $\pm$ 8.5
	JEV	18.7 $\pm$ 3.1	1038.2 $\pm$ 53.4*
	none	18.3 $\pm$ 4.5	17.5 $\pm$ 6.5
C57BL/6J <sup>Jcl</sup> (H-2 <sup>b</sup> )	WNV	24.1 $\pm$ 7.2	22.1 $\pm$ 4.4
	JEV	26.3 $\pm$ 8.6	24.7 $\pm$ 3.9
	none	25.0 $\pm$ 6.5	20.1 $\pm$ 4.2
BALB/cAJ <sup>Jcl</sup> (H-2 <sup>d</sup> )	WNV	15.7 $\pm$ 2.5	21.1 $\pm$ 7.1
	JEV	18.9 $\pm$ 3.6	23.7 $\pm$ 5.8
	none	23.3 $\pm$ 7.5	24.7 $\pm$ 2.2

\*対応するウイルスおよび MHC の共培養下において、有意な IFN- $\gamma$  の産生が認められた。

PEC : 腹腔細胞

表 2. WNV 感染マウス脳分離 T 細胞における WNV 感染細胞との共培養前後におけるクローナリティーの変化

Clonal frequency	V	N	J	J gene	
VA1-1 (pre-stimulation)					
12/55	CAVS	IG	NSGTYQRFG	AJ13	#
10/55	CAVS	LA	NSGTYQRFG	AJ13	\$
8/55	CAVS	MG	NSGTYQRFG	AJ13	§
7/55	CAVS	KG	NSGTYQRFG	AJ13	†
6/55	CAV	RPT	ASLGKLQFG	AJ24	‡
4/55	CAVS	PG	NSGTYQRFG	AJ13	
4/55	CAVS		TNAYKVIFG	AJ30	
2/55	CAVS	RG	NSGTYQRFG	AJ13	
1/55	CAVS	RG	QGGRALIFG	AJ15	
1/55	CAVS	MG	GYQNFYFG	AJ49	
VA1-1 (post-stimulation)					
37/52	CAVS	IG	NSGTYQRFG	AJ13	#
10/52	CAVS	MG	NSGTYQRFG	AJ13	§
3/52	CAVS	KG	NSGTYQRFG	AJ13	†
1/52	CAVS	LA	NSGTYQRFG	AJ13	\$
1/52	CAV	RPT	ASLGKLQFG	AJ24	‡
VA2-1 (pre-stimulation)					
14/51	CAAS	EA	GNKYVFG	AJ40	#
11/51	CAAS	EG	GNKYVFG	AJ40	\$
7/51	CAAS	G	GSALGRLHFG	AJ18	
6/51	CAA	RG	NNYAQGLTFG	AJ26	§
4/51	CAAS	VA	GNKYVFG	AJ40	†
3/51	CAAS	G	NNYAQGLTFG	AJ26	
2/51	CAAS	NA	NAYKVIFG	AJ30	
2/51	CAA	I	TGGNNKLTFG	AJ56	
1/51	CA	PRG	NNYAQGLTFG	AJ26	
1/51	CAAS	P	TNAYKVIFG	AJ30	
VA2-1 (post-stimulation)					
35/54	CAAS	EG	GNKYVFG	AJ40	\$
16/54	CAAS	EA	GNKYVFG	AJ40	#
2/54	CAA	RG	NNYAQGLTFG	AJ26	§
1/54	CAAS	VA	GNKYVFG	AJ40	†

8 頭のマウス脳分離 T 細胞をプールして使用し、VA1-1 および VA2-1 の CDR3 アミノ酸配列を解析した。WNV 感染細胞と 3 日間共培養したものを post-stimulation とした。pre- および post-stimulation 間で認められた同一配列をシンボルで示した。

