

- ① 生活衛生センター
- ② 庄内緑地
- ③ 名城公園
- ④ 衛生研究所
- ⑤ 神宮東公園
- ⑥ ガーデン埠頭
- ⑦ 宝神水処理センター
- ⑧ 農業文化園

以上 表 2.の捕獲場所を示す。

図 5. 名古屋市行政区配置図

表 1. デングウイルス検出マルチプレックス PCR 用プライマー&標識プローブ

| sub-type | Primer and TaqMan Probe Name | Dye | sequence |
|----------|------------------------------|---------|--|
| type 1 | D1MGBEn469s | forward | gaacatggracaaytgcaacyat |
| | D1MGBEn493p | probe | FAM-MGB acacctcaagetcc |
| | D1MGBEn536r | reverse | ccgtagtcdgtcagctgtatttca |
| type 2 | D2MGBEn493s | forward | acaccacagagttccatcacaga |
| | D2MGBEn545p | probe | NED-MGB cgatggartgctctc |
| | D2MGBEn568r | reverse | catctcattgaagtcnaggcc |
| type 3 | D3MGBEn1s | forward | atgagatgytgaggagtrggaaac |
| | D3MGBEn27p | probe | VIC-MGB agatdddgtggaaggyct |
| | D3MGBEn71r | reverse | caccacdtcaaccacgtagct |
| type 4 | D4TEEn711s | forward | ggtgacrtyaargthcctcat |
| | D4TEEn734p | probe | ROX-BHQ ccaagagacaggatgtgacagtgctrggatc |
| | D4TEEn786r | reverse | wgartgcatrgctccytctg |

表 2. 名古屋市内でドライアイストラップにより捕獲したカ

| 捕集年月日 | 捕集地点 | シナハマダラカ | ヒトスジシマカ | アカイエカ群 | コガタアカイエカ |
|-----------|-----------|----------|---------|--------|----------|
| 2011/5/12 | 生活衛生センター | | | 4 | |
| | 庄内緑地公園 | | | 12 | |
| | 名城公園 | | | 6 | |
| | 衛生研究所 | | | 4 | |
| | 神宮東公園 | | | 2 | |
| | ガーデン埠頭 | | | | |
| | 宝神水処理センター | | | 6 | |
| | 農業文化園 | | | 3 | |
| | 2011/5/24 | 生活衛生センター | | | |
| 庄内緑地公園 | | | | 14 | |
| 名城公園 | | | | 1 | |
| 衛生研究所 | | | 1 | 2 | |
| 神宮東公園 | | | | 1 | |
| ガーデン埠頭 | | | | | |
| 宝神水処理センター | | | | 1 | |
| 農業文化園 | | | 2 | 1 | |
| 2011/6/14 | | 生活衛生センター | | | 1 |
| | 庄内緑地公園 | | 3 | 22 | |
| | 名城公園 | | 1 | 7 | |
| | 衛生研究所 | | 10 | 42 | |
| | 神宮東公園 | | 2 | 17 | |
| | ガーデン埠頭 | | | | |
| | 宝神水処理センター | | 1 | 3 | |
| | 農業文化園 | | 2 | 19 | 4 |
| | 2011/6/28 | 生活衛生センター | | | 3 |
| 庄内緑地公園 | | | | 18 | |
| 名城公園 | | | 3 | 5 | |
| 衛生研究所 | | | 11 | 50 | |
| 衛生研究所 | | | | 50 | |
| 衛生研究所 | | | | 50 | |

| | | | | | |
|-----------|-----------|---|----|----|----|
| | 衛生研究所 | | | 32 | |
| | 神宮東公園 | | | 6 | |
| | ガーデン埠頭 | | | 1 | |
| | 宝神水処理センター | | | 6 | |
| | 農業文化園 | | 6 | 17 | 2 |
| 2011/7/12 | 生活衛生センター | | 1 | 2 | |
| | 庄内緑地公園 | | | 14 | |
| | 名城公園 | | 2 | 6 | |
| | 衛生研究所 | | 4 | 21 | |
| | 神宮東公園 | | 5 | 8 | |
| | ガーデン埠頭 | | | 1 | |
| | 宝神水処理センター | | | 4 | |
| | 農業文化園 | | 11 | 13 | 8 |
| 2011/7/26 | 生活衛生センター | | | | |
| | 庄内緑地公園 | | 4 | 3 | 1 |
| | 名城公園 | | | 1 | |
| | 衛生研究所 | 1 | 25 | 50 | |
| | 衛生研究所 | | | 50 | |
| | 衛生研究所 | | | 6 | |
| | 神宮東公園 | | 1 | 1 | |
| | ガーデン埠頭 | | | | |
| | 宝神水処理センター | | | 6 | |
| | 農業文化園 | 1 | 2 | 3 | 12 |
| 2011/8/9 | 生活衛生センター | | 1 | 1 | |
| | 庄内緑地公園 | | 1 | 3 | |
| | 名城公園 | | 2 | 7 | |
| | 衛生研究所 | | 50 | 43 | |
| | 衛生研究所 | | 50 | 3 | |
| | 衛生研究所 | | 21 | | |
| | 神宮東公園 | | 8 | | |
| | ガーデン埠頭 | | | | |
| | 宝神水処理センター | | 3 | | |

| | | | | | |
|------------|-----------|--|----|----|----|
| | ー | | | | |
| | 農業文化園 | | 50 | 13 | 26 |
| | 農業文化園 | | 1 | | |
| 2011/8/23 | 生活衛生センター | | 2 | 1 | |
| | 庄内緑地公園 | | 5 | 3 | |
| | 名城公園 | | 5 | 2 | |
| | 衛生研究所 | | 50 | 50 | |
| | 衛生研究所 | | 39 | 50 | |
| | 神宮東公園 | | 7 | 1 | |
| | ガーデン埠頭 | | | | |
| | 宝神水処理センター | | 2 | 1 | 1 |
| | 農業文化園 | | 18 | 10 | 40 |
| 2011/9/13 | 生活衛生センター | | 6 | 1 | |
| | 庄内緑地公園 | | 8 | 2 | |
| | 名城公園 | | 12 | 12 | |
| | 衛生研究所 | | 50 | 22 | |
| | 衛生研究所 | | 17 | | |
| | 神宮東公園 | | | 3 | |
| | ガーデン埠頭 | | | | |
| | 宝神水処理センター | | 2 | 1 | |
| | 農業文化園 | | 16 | 5 | 22 |
| 2011/9/27 | 生活衛生センター | | | 1 | |
| | 庄内緑地公園 | | 3 | 2 | |
| | 名城公園 | | | 2 | |
| | 衛生研究所 | | 8 | 7 | |
| | 神宮東公園 | | | | |
| | ガーデン埠頭 | | | | |
| | 宝神水処理センター | | 1 | 3 | |
| | 農業文化園 | | 19 | 3 | |
| 2011/10/12 | 生活衛生センター | | | | |
| | 庄内緑地公園 | | 3 | 1 | |
| | 名城公園 | | 4 | 18 | |

| | | | | | |
|------------|-----------|---------|---------|--------|----------|
| | 衛生研究所 | | 21 | 10 | |
| | 神宮東公園 | | 6 | 2 | |
| | ガーデン埠頭 | | | 1 | |
| | 宝神水処理センター | | 1 | 4 | |
| | 農業文化園 | | 6 | 3 | |
| 2011/10/25 | 生活衛生センター | | 1 | 1 | |
| | 庄内緑地公園 | | 3 | 1 | |
| | 名城公園 | | 3 | 13 | |
| | 衛生研究所 | | 23 | 30 | |
| | 神宮東公園 | | 2 | 3 | |
| | ガーデン埠頭 | | | | |
| | 宝神水処理センター | | 2 | 19 | |
| | 農業文化園 | | 1 | 1 | |
| | | | | | |
| 集計 | | シナハマダラカ | ヒトスジシマカ | アカイエカ群 | コガタアカイエカ |
| 頭数 | | 2 | 630 | 954 | 116 |
| プール数 | | 2 | 62 | 88 | 9 |

表 3. 名古屋市内で人囮法で捕獲したヒトスジシマカのウイルス保有状況

| 日付 | 区 | 地点 | 捕集数 | デング | チクングニア | ウエストナイル | 日本脳炎 |
|-------|----|-------|-----|-----|--------|---------|------|
| 6月17日 | 千種 | 赤坂公園 | 17 | (-) | (-) | (-) | (-) |
| 7月8日 | 中川 | 荒越公園 | 38 | (-) | (-) | (-) | (-) |
| 7月8日 | 中川 | 荒越北公園 | 38 | (-) | (-) | (-) | (-) |
| 7月14日 | 千種 | 赤坂公園 | 50 | (-) | (-) | (-) | (-) |
| 7月21日 | 中川 | 荒越公園 | 29 | (-) | (-) | (-) | (-) |
| 7月21日 | 中川 | 荒越北公園 | 40 | (-) | (-) | (-) | (-) |
| 7月27日 | 千種 | 赤坂公園 | 31 | (-) | (-) | (-) | (-) |
| 8月4日 | 熱田 | 神宮東公園 | 58 | (-) | (-) | (-) | (-) |
| 8月18日 | 千種 | 赤坂公園 | 56 | (-) | (-) | (-) | (-) |
| 8月18日 | 千種 | 赤坂公園 | 52 | (-) | (-) | (-) | (-) |
| 8月18日 | 千種 | 赤坂公園 | 50 | (-) | (-) | (-) | (-) |
| 8月18日 | 千種 | 赤坂公園 | 50 | (-) | (-) | (-) | (-) |
| 8月18日 | 千種 | 赤坂公園 | 50 | (-) | (-) | (-) | (-) |

| | | | | | | | |
|-------|----|------|-----|-----|-----|-----|-----|
| 8月18日 | 千種 | 赤坂公園 | 50 | (-) | (-) | (-) | (-) |
| 8月18日 | 千種 | 赤坂公園 | 47 | (-) | (-) | (-) | (-) |
| 9月2日 | 千種 | 赤坂公園 | 55 | (-) | (-) | (-) | (-) |
| 9月7日 | 中川 | 荒越公園 | 43 | (-) | (-) | (-) | (-) |
| 9月15日 | 千種 | 赤坂公園 | 56 | (-) | (-) | (-) | (-) |
| 9月22日 | 中川 | 荒越公園 | 59 | (-) | (-) | (-) | (-) |
| 合計 | | | 869 | | | | |

Culex flavivirus 感染性 cDNA クローンの構築

分担研究者 沢辺京子(国立感染症研究所・昆虫医科学部)

研究協力者 伊澤晴彦・鋤田龍星・星野啓太・佐々木年則・小林睦生(同・昆虫医科学部)
田島茂・高崎智彦(同・ウイルス第一部)

研究要旨

Culex flavivirus (CxFV) は日本の *Culex* 属蚊から初めて発見された昆虫特異的フラビウイルスの一種で、近年世界各地の *Culex* 属蚊に広く分布していることが明らかになってきた。さらにごく最近になり、世界各地で新規な昆虫特異的フラビウイルスの発見が相次いでおり、その多様性や宿主蚊特異性が注目されている。また、蚊種によっては、これら昆虫特異的フラビウイルスが高率に感染している事例も報告されており、自然界では蚊媒介性フラビウイルスとの重複感染が想定されることから、宿主蚊における重複感染が、双方のウイルスの感染動態や地理的分布に及ぼす影響についても検討が必要であると考えられる。

多くの蚊媒介性フラビウイルスでは、感染性 cDNA クローンによるリバーシジェネティクス系の利用により、ウイルス増殖特性に関する分子生物学的な解析が急速に進んでいる。そこで本研究では、CxFV のリバーシジェネティクス系を確立し、昆虫特異的フラビウイルスの増殖・病原性・宿主特異性など解析に有用な新たな実験系の構築を試みた。

その結果、低コピープラスミドである pMW119 を用いることで CxFV の感染性 cDNA クローンの構築に成功し、昆虫特異的フラビウイルスのリバーシジェネティクス系が初めて確立された。今回開発された実験系をもとに、今後昆虫特異的フラビウイルスの増殖・病原性・宿主特異性などの解明につながる多くの有用な情報が得られることが期待される。

A. 研究目的

フラビウイルス科フラビウイルス属のウイルスの多くは、蚊やダニ等の吸血性節足動物をベクターとするアルボウイルスであるが、本属には脊椎動物のみを宿主とするグループや昆虫(蚊)のみを宿主とするグループも含まれている。後者は Insect-specific flavivirus (昆虫特異的フラビウイルス)あるいは単に Insect flavivirus (昆虫フラビウイルス)と呼ばれ、自然界では宿主蚊における垂直伝播により維持されていると考えられている。昆虫特異的フラビウイルスとしては、これまでネッタイシマカ *Aedes aegypti* の培養細胞から発見された Cell fusing agent virus (CFAV) と、ケニアの *Ae.*

macintoshi から分離された Kamiti River virus (KRV) が知られるのみであった。

我々は、2003 年度より着手した国内外の野外捕集蚊における蚊媒介性ウイルスの保有状況調査の過程で、日本のアカイエカ種群蚊 *Culex pipiens* group, コガタアカイエカ *Cx. tritaeniorhynchus*, およびインドネシアのネッタイエカ *Cx. quinquefasciatus* から、これまでに報告のない新規の昆虫特異的フラビウイルス *Culex flavivirus* (CxFV) を発見し報告した。近年、CxFV は世界各地の *Culex* 属蚊に広く分布している昆虫特異的フラビウイルスであることが明らかになってきた。しかしこれまでのところ、同所的に生息している

Aedes 属等の蚊種からは全く検出されないことから、本ウイルスは *Culex* 属蚊にきわめて特異性の高いウイルスであると考えられる。

さらに近年、世界各地の蚊から新規な昆虫特異的フラビウイルスの分離・検出報告が相次ぎ、その多様性と宿主蚊特異性との関連が注目されている。また蚊種によっては、これら昆虫特異的フラビウイルスが高率に感染している事例も報告されており、自然界では蚊媒介性フラビウイルスとの重複感染も十分想定される。このため、宿主蚊における重複感染が、双方のウイルスの感染動態や地理的分布に及ぼす影響について詳しい検討が必要であると考えられる。

今日、多くのフラビウイルスでは感染性 cDNA クローンによるリバーシジェネティクス系の普及により、ウイルス増殖特性等に関する分子レベルでの性状解析が急速に進んでいる。そこで本研究では、CxFV のリバーシジェネティクス系を確立し、昆虫特異的フラビウイルスの増殖・病原性・宿主特異性など解析に有用な新たな実験系の構築を試みた。

B. 研究方法

1. CxFV 完全長 cDNA の構築

2003 年東京都下で捕集されたアカイエカ種群蚊から分離された CxFV NIID21 株 (GenBank Accession No. AB377213) を C6/36 細胞に感染させた。感染 5 日後の培養上清からウイルス RNA を抽出し、これをもとにウイルスゲノム cDNA を作製した。この cDNA をテンプレートとして、ウイルスゲノムを一部オーバーラップする 4 つの領域に分け、それぞれの領域を PCR で増幅した。その際、5'側には T7 プロモーター配列を、3'末端側には run-off product 生成のための制限酵素部位 *Kpn* I を付加するようにプライマーを設計した。それぞれの増幅断片は制限酵素処理後、順次、低コピープラスミドである pMW119 にサブクローニングした (図 1)。宿主大腸菌には

DH5 α あるいはSTBL2を用いた。最終的に作製されたウイルス完全長 cDNA を含むプラスミドは、塩基配列の確認後、大量に精製し、以後の実験に用いた。

2. *In vitro* transcription

ウイルス完全長 cDNA を含むプラスミドを制限酵素 *Kpn* I で消化・精製したものをテンプレートとして T7 RNA polymerase 存在下で *in vitro* transcription を行った。次に DNase によりテンプレート DNA を消化させ、一部を変性アゲロースゲルで電気泳動し、転写された RNA を確認した。RNA はカラム精製し、滅菌水に懸濁したものを以後の実験に用いた。

3. 組換えウイルスの作製

精製したゲノム長の RNA を常法に従いリポフェクション法により C6/36 細胞に導入した。RNA 導入後の細胞は 6 日間培養し、さらに blind passage を 2 回繰り返した。組換えウイルス粒子の産生は、特異的 RT-PCR と培養上清の電子顕微鏡観察により行った。

4. 親株ウイルスと組換えウイルスの増殖能の比較

親株ウイルスと組換えウイルスの増殖特性を比較するために、定量的 RT-PCR を行った。まず、親株ウイルス、組換えウイルスそれぞれを等力価で C6/36 細胞に接種し、8 日目までの培養上清を 24 時間毎に回収した。回収した上清から RNA を抽出し、定量的 RT-PCR でゲノム RNA のコピー数を定量した。ここでは、CxFV の E 領域の一部分 (定量的 RT-PCR で増幅される領域を含む) を PCR および *in vitro* transcription により合成し、コピー数を測定したものを、検量線作成のためのスタンダード RNA として用いた。

C. 結果

CxFV NIID21 株の全長 cDNA を含むプ

ラスミドが構築され(rCXFV/pMW119, 図 1), この組換えプラスミドを持つ大腸菌は適切な培養条件下で安定に増殖させることが可能であった. この組換えプラスミドから *in vitro* transcription によりウイルス全長に相当する RNA を調製した. 作製した RNA を電気泳動したところ, ウイルスゲノム長に相当する約 10kb の位置に明瞭な単一バンドが確認された(図 2). この RNA を C6/36 細胞に導入した結果, 親株を同様の細胞変性効果 (CPE) が確認された(図 3a-c). この培養上清から RNA を抽出し, Cx FV 特異的 RT-PCR を行ったところ, 特異断片が増幅された. さらに培養細胞上清を電子顕微鏡観察したところ, 親株ウイルスと同様の球状粒子が確認された(図 3d, e). 以上の結果から, Cx FV 感染性 cDNA クローンの構築が成功したことが確認された. 親株ウイルスと作成された組換えウイルスの感受性細胞における増殖性を比較した結果, ほぼ同等の増殖特性を持つことが確認された(図 4).

D. 考察

本研究により, 昆虫特異的フラビウイルスのリバースジェネティクス系が初めて確立された. 今後は作製された感染性 cDNA クローンをもとに, 点変異の導入や部分欠損をもたせるように改変した組換えウイルスを作製することにより, 昆虫特異的フラビウイルスの増殖・病原性・宿主特異性などの解明につながる有用な情報が得られることが期待される.

E. 結論

- 1) 昆虫特異的フラビウイルスである Cx FV の感染性 cDNA クローンの構築に成功した.
- 2) 作製された組換え Cx FV は親株ウイルスと同等の細胞障害性, 増殖特性, 粒子形態を保持していた.
- 3) 今後は, 点変異の導入や部分欠損をもたせるように改変した組換えウイルスを作製することにより, Cx FV の増殖・病原性・宿主特異性などの解明につながる有用な情報が得られることが期待された.

G. 研究発表

1. 論文発表:

Isawa, H., Kuwata, R., Tajima, S., Hoshino, K., Sasaki, T., Takasaki, T., Kobayashi, M., Sawabe, K. (2012). Construction of an infectious cDNA clone of *Culex* flavivirus, an insect-specific flavivirus from *Culex* mosquitoes. *Archives of Virology*. in press.

2. 学会発表: なし

H. 私的財産権の出願・登録状況

1. 特許情報: なし

2. 実用新案登録: なし

3. その他: なし

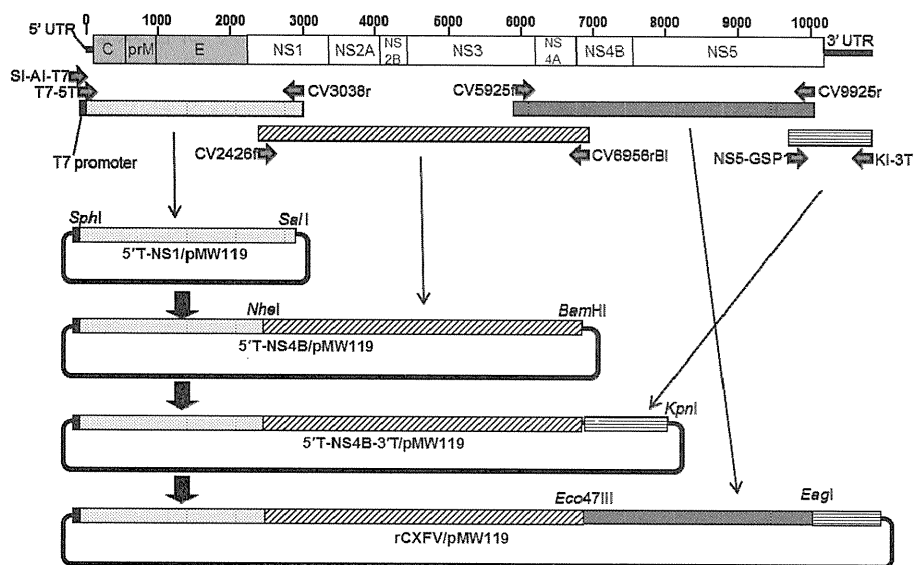


図 1. CxvFV 完全長 cDNA クローンの構築手順

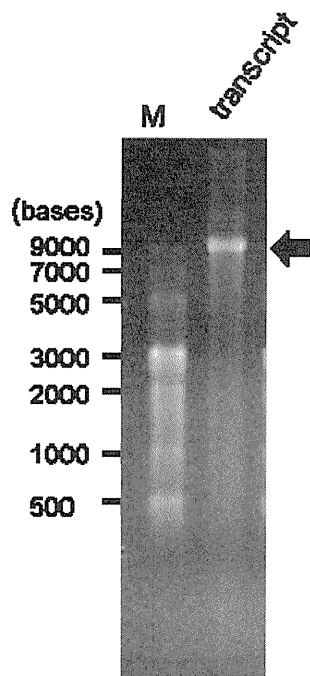


図 2. 完全長 cDNA クローンを鋳型とした *in vitro* 転写物の変性アガロースゲル電気泳動
M; RNA サイズマーカー

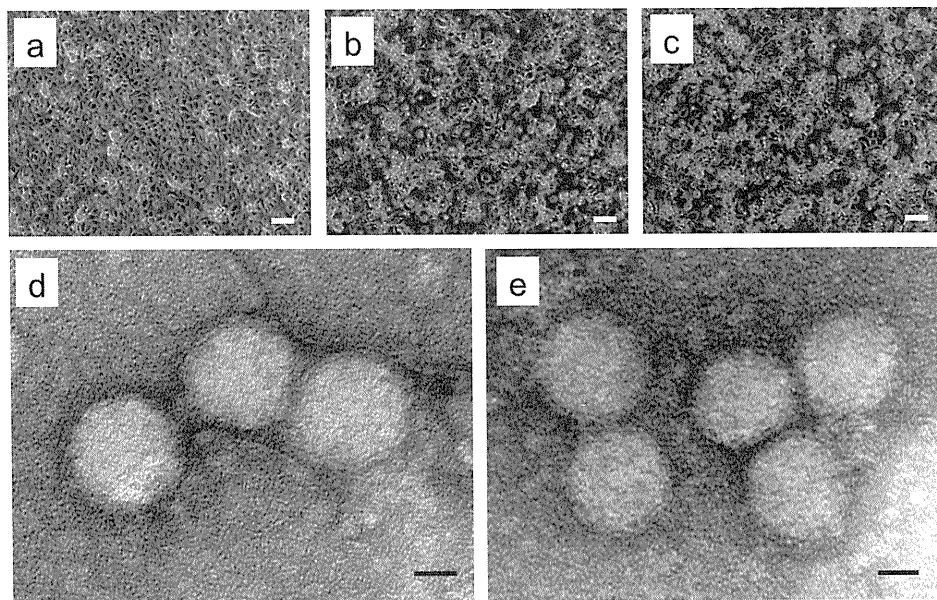


図3. 上段)感染後5日目のC6/36細胞 a)対照 b)親株ウイルス c)組換えウイルス
棒は100 μ m
下段)培養上清の電子顕微鏡像 d)親株ウイルス e)組換えウイルス
棒は20 nm

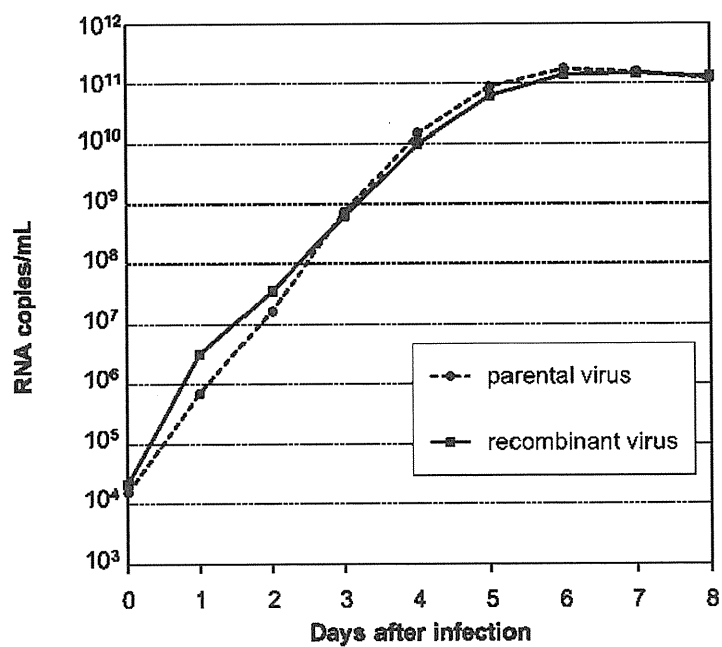


図4. 定量的PCRによる親株ウイルスと組換えウイルスの増殖特性の比較(C6/36細胞)

デング1型ウイルスエンベロープ蛋白上の中和及び増強エピトープの解析

研究分担者 小西 英二 (国立大学法人大阪大学)

研究要旨 デング熱・デング出血熱は最重要の蚊媒介性ウイルス疾患であるが予防ワクチンは無い。開発中のワクチンは多くが中和抗体誘導型であるが、感染増強抗体をも誘導する懸念が指摘されてきた。この3年間の研究班では、安全なデングワクチン開発に資するため、デング DNA ワクチン免疫マウスモデルを用いて増強抗体の本質にアプローチした。一昨年度は、血清中の中和活性と増強活性のバランスを測定する方法を開発し、デングワクチンが感染増強抗体を誘導するが、補体存在下では消失することを示した。昨年度は、中和抗体誘導型のワクチンが誘導する増強抗体をさらに詳細に調べるために、デング1型ウイルス免疫マウスから樹立したモノクローナル抗体を用いて、中和活性のみを示す抗体及び増強活性のみを示す抗体の性状解析を行った。今年度は、これらの抗体を用いた抗原エピトープ解析を行い、増強活性の発現には抗体のサブクラスが重要であると共に、エピトープ自体も関与している可能性を示した。

A. 研究目的

デング熱・デング出血熱は、熱帯・亜熱帯地域に広く流行する世界で最も重要な蚊媒介性ウイルス疾患である。非流行地域においても、輸入感染症として公衆衛生上の問題となる。罹患者数の多さ（年間推定5千万から1億人）と共に、重篤度（デング出血熱は適切な処置がなければ致死率10%以上）も重要視される因子である。ネッタイシマカに次ぐデングウイルス媒介蚊であるヒトスジシマカはわが国の東北以南に生息するため、輸入感染症としてウイルスが侵入すると国内流行を起こす可能性がある。しかし現在のところ、認可ワクチンはなく特異的な治療法も確立されていない。

防御の中心的役割を果たすのは中和抗体と考えられている。このため、ワクチン開発の主流は中和抗体を誘導するタイプのものである。血中の中和抗体はウイルス血症レベルを低下させる有効な因子である。さらに上記のように、デング熱・デング出血熱は蚊媒介性ウイルス疾患であるため、中

和抗体は媒介蚊への伝播効率を下げることにもつながる。したがって、中和抗体誘導型のワクチンは、個体を病気から守るのみならず、流行を抑えて社会を守る理想的なワクチンと考えられる。

しかし一方で、中和抗体は低濃度では感染増強活性を有する。そこで最近、中和抗体誘導型のワクチンにおける感染増強抗体の誘導が指摘されてきた。中和抗体とは逆に感染増強抗体はウイルス血症レベルを高くするほうに働き、したがってデングの重症化に関与する。ワクチン接種により防御される期間はあるが、やがて重症型の患者を増やす可能性は、デングワクチンの安全性に関わる重大な問題である。

この問題を解決するためには、感染増強活性を正確に測定し、増強抗体誘導に関わる抗原エピトープを詳細に解析する必要がある。この3年間の研究班では、安全なデングワクチン開発に寄与するため、マウスを用いたデング DNA ワクチンモデルを用いて増強抗体の特性解析を一貫して行った。

一昨年度は、ワクチンによって誘導された抗体の中和活性及び増強活性という生体内での相反する2つの活性のバランスを検出する測定法を開発した。生体内でのポリクローナルな状態では、中和抗体種と増強抗体種が共に存在するため、両抗体活性のバランスを対象とすることが、正確な測定につながる。また、その方法を用いて Dengue 4 価 DNA ワクチンを接種したマウスが感染増強抗体を誘導することが示されたが、補体の存在下では増強活性が消失するか中和抗体に転ずることが明らかにされた。昨年度はこの現象をさらに詳しく調べるために、クローナルレベルの研究を行った。すなわち、Dengue 1 型 DNA ワクチンで免疫したマウスから樹立したモノクローナル抗体 (MAb) を用いて、その中和活性及び増強活性を調べた。その結果、中和活性のみを示す抗体 (NAb) 及び増強活性のみを示す抗体 (EAb) の存在が明らかにされた。中和活性を示せば低濃度で増強活性を示す抗体 (NEAb) が多く存在する中、これらの稀な抗体はエピトープ研究の有力なツールとなる。本年度は、これらのモノクローナル抗体を用いて Dengue 1 型ウイルス (E) 抗原上のエピトープをさらに詳細に解析し、増強活性の発現を規定する因子を考察した。

B. 研究方法

細胞: Vero 細胞は、10%ウシ胎児血清 (FBS) 添加イーグル MEM で 37°C、5%CO₂ の条件下で培養した。C6/36 細胞は、上記の培養液に非不可欠アミノ酸を添加したもので 28°C、5%CO₂ の条件下で培養した。K562 細胞は、10%FBS 及び 1%ペニシリン・ストレプトマイシン添加 RPMI-1640 で 37°C、5%CO₂ の条件下で培養した。K562 細胞は浮遊系の細胞であるが、接着する細胞を選択して継代し、準接着系に馴化させた。

ウイルス: Dengue 1 型ウイルス (DENV1)

の望月株を用いた。C6/36 細胞に感染させて得られた培養液を中和・増強活性の測定に用いた。

モノクローナル抗体: DENV1 望月株を免疫原として作製した6種類のマウスモノクローナル抗体 (D1-IV-1C8、D1-V-8E8、D1-I-11G12、D1-V-3H12、D1-IV-3B8、D1-IV-7F4) を用いた。

従来の感染増強試験: 感染細胞率に基づく方法を用いた。1×10⁵ 個の U937 細胞に、10 倍階段希釈した検体 (腹水) 50 µl を加え、さらに 150 µl に調製した DENV を加えて、37°C で 2 時間保温した。補体を含む系では、150 µl の DENV1 に 10 µl のウサギ補体 (Low-Tox®-M Rabbit Complement、セダレーン、カナダ) を含有させた。この細胞浮遊液を遠心後、細胞を 1 ml の培養液に再浮遊し、培養 4 日後に細胞を回収し、免疫染色により感染細胞率を求めた。陰性対照 (抗体非添加) で得られた平均値 + 2×標準偏差 (SD) 以上を示した場合に、増強活性陽性と判定した。

従来の中和試験: Vero 細胞を用いて、90% プラーク減少法により中和抗体価を測定した。

中和・増強活性のバランス測定法: ポリ-L-リジンでコーティングした 96 穴マイクロプレートを使用し、モノクローナル抗体と Dengue ウイルスを混合した。具体的には、各ウエルで検体 (腹水) を 36 µl に 10 倍階段希釈し、50 µl の 100 FFU の DENV1 (補体を含む系では、ここに 5 µl のウサギ補体を含む) を加えて、37°C で 2 時間保温した。さらに、50 µl に浮遊した 1×10⁵ 個の準接着系 K562 細胞を各ウエルに加えて 24~48 時間 37°C で培養した。陰性対照として、抗体を加えていない 8 ウエルを設けた。固定後、免疫染色により感染細胞数を求めた。陰性対照で得られた平均値 + 3SD 以上を示した場合に増強活性陽性、平均値 - 3SD 以下を示した場合に中和活性陽性と判定した。

抗体のアフィニティ精製及びビオチン化：Protein G Sepharose 4 Fast Flow(GE Healthcare, England)を用いて、腹水中のIgGを精製し、EZ-Link™ Sulfo-NHS-LC-Biotin (Thermo, Rockford, IL)を用いてビオチン化した。

競合試験：マイクロプレートに1:1000に希釈したウサギ抗 DENV1 ポリクローナル抗体を感作し、0.05%Tween20 及び 1%ウシ血清アルブミン (BSA) 添加リン酸生理緩衝液により 1:4 に希釈した DENV1 感染 Vero 細胞培養液、1:20 から 10 倍階段希釈した一次抗体、1:2500 に希釈したビオチン化二次抗体、1:500 に希釈したアルカリホスファターゼ標識アビジン (Vector Laboratories, Burlingame, CA) を順に 37°C で 1 時間反応させた。一次抗体非添加ウエルで得られた吸光度と比較して阻害率を求めた。

エピトープマッピング：エスケープミュータントの作製は、DENV1 を低 moi で Vero 細胞に接種した後、MAb 添加培養液で 7 日間培養し、これを 3~4 回繰り返した。MAb の濃度は、中和抗体価が 1 : 10⁻¹ : 40 となるように調整した。エスケープミュータントが得られにくいときには低い濃度から始め、継代ごとに濃度を高める工夫を行った。シーケンス解析には、エスケープミュータント感染 Vero 細胞培養液から TRIzoL Reagent (Invitrogen, San Diego, CA)を用いてウイルス RNA を抽出し、TermoScript RT-PCR System (Invitrogen)を用いて cDNA を合成した。TaKaRa Ex Taq (タカラバイオ、日本)を用いて PCR 反応を行い、prM 及び E 領域の塩基配列を決定した。また、EAb のエピトープマッピングは、prM と E 遺伝子を組み込んだプラスミドを用いて、E 領域のアミノ酸に変異を入れることにより行った。すなわち、変異を入れたプラスミドを発現させた細胞を抗原とした免疫染色により、反応性の有無

を判定してエピトープの位置を推定した。

抗体エンジニアリング：ハイブリドーマから TRIzoL Reagent を用いて RNA を抽出し、cDNA 合成及び PCR 反応により抗体可変部の遺伝子を増幅し、シーケンス解析を行った。プライマーには、Mouse Ig-Primer Set (Merck, Germany)を用いた。次に、抗体可変部の塩基配列に基づいて特異的なプライマーを設計し、PCR 法による遺伝子増幅の後、マウス IgG 発現ベクター(pFUSE, InvivoGen, San Diego, CA)に組み込んだ。

(倫理面への配慮)

本研究における動物実験は神戸大学動物実験委員会により、また遺伝子組換え実験は神戸大学遺伝子組換え実験安全委員会により承認された後に実施した。

C. 研究結果

MAb のアイソタイプと DENV1 に対する中和・増強活性：本研究で使用した MAb は 6 種類である。3 種類の NEAb は競合試験で相互に反応阻害を示したものであり、同一あるいは一部重なったエピトープを認識すると考えられる (データ示さず)。2 種類の EAb も互いに反応阻害を示した。NEAb、EAb 及び NAb は相互に反応阻害を示さず、異なるエピトープに対応することが示された。

これらの MAb のアイソタイプと中和・増強活性を表 1 に示す。ここで用いた中和試験及び増強試験は従来の方法である。3 種類の NEAb は中和活性と増強活性の両方を示し、2 種類の EAb は増強活性のみを示した。NAb は 1 種類しか得られなかったが、高い中和活性を認め、増強活性を示さなかった。アイソタイプは、NEAb は IgG1 あるいは IgG2b、EAb は IgG1、また NAb は IgG3 であった。

エピトープマッピング：NEAb 及び NAb を用いてエスケープミュータント作製を試

みた。その結果、ミュータントが得られたものについて、その塩基及びアミノ酸の変異を表2にまとめた。3種のNEAbは、いずれもE蛋白の325番目のアミノ酸がリジンからグルタミン酸に代わる変異(325K→Eと表記)を示し、同一あるいは一部重なったエピトープを認識するという競合試験の結果と一致した。また、NAbについては、昨年度行い、報告書に記載したように118番目のアミノ酸に変異を示した(K→E)。これらの変異アミノ酸は、いずれもE蛋白の立体構造上、表面に位置するものであり(図1)、この部位あるいは近辺にこれらのMAbに対するエピトープが存在すると推定された。さらに、特定の変異の入ったミュータントに対する抗体の反応性を、中和・増強活性バランスを指標に調べた。一部の抗体で得られた結果を図2に示す。親株に対して示された反応性は、ミュータントに対して消失した。また、EAbにおいては、172、284、291番目に変異を入れたE抗原に対する反応性が低く、この近辺にエピトープが存在すると推定された。

アイソタイプが中和・増強活性バランスに及ぼす影響：アイソタイプの違いが抗体活性にどのような影響を与えるのかを明らかにするため、抗体エンジニアリングにより、同一のFab配列を有するがアイソタイプの異なる4種類の抗体を作製して、DENV1に対する中和・増強活性のバランスを比較した。図3に、D1-I-11G12を用いて得られた結果を示す。トランスフェクトした細胞培養液中のIgG濃度はハイブリドーマの培養液とほぼ同程度であった。この濃度範囲では、本来のアイソタイプであるIgG1コンストラクトは抗体原液から増強活性を示し、親抗体と類似の濃度依存性曲線パターンを示した。一方、IgG2aやIgG2bコンストラクトでは、補体非存在下では増強活性を示すものの、補体の添加により中和活性を示した。さらに、IgG3コンストラ

クトでは補体の存在に関わりなく中和活性を示した。

D. 考察

中和抗体誘導型デングワクチンは増強抗体を誘導する懸念があり、安全なワクチン開発のためには増強抗体の誘導に配慮する必要がある。増強抗体は、デングウイルスE抗原上のエピトープにより、ヒトの免疫機構により誘導されるものであるため、エピトープ解析がこの懸念に対する最も有力な解決方法となる。

中和活性と増強活性のバランスは、*in vitro*試験における補体の添加により大きく影響を受けることがある。一昨年度は、デング4価DNAワクチン免疫マウスが示した感染増強活性が、補体の添加により消失するか中和抗体に転じることを示した。しかし、デング流行地の住民の血清を調べると、補体の添加に影響を受けない抗体を保持する集団が多いことも明らかとなり、ヒトにおいては必ずしも正常レベルの補体が増強抗体を抑制するわけではないことが推定された。特に、中和抗体は補体依存性であり増強抗体は非依存性であった。また、感染初期には補体依存性中和抗体を、また感染後期には補体非依存性増強抗体を保持する割合が多かった。この現象をさらに詳しく調べるためには、クローナルレベルの解析が必要である。そこで昨年度から、デング1型マウス免疫モデルを用いて、モノクローナル抗体の性状解析を行った。

デングウイルスE蛋白分子は、3つのドメインから構成される。ドメインⅢはレセプター認識部位を含む。したがって、ドメインⅢに結合する抗体は、ウイルスが細胞表面に接着することを効率よく阻害できる。そのため、中和抗体の多くはドメインⅢを標的にする。逆に、他のドメインに結合する抗体は中和活性よりも増強活性を示す傾向にあると考えられる。一方、ドメインⅡ

は融合ペプチドを先端に持つ、これもウイルス感染初期に重要な役割を果たす部位である。昨年度の本研究で、NAb (D1-IV-7F4) はドメインIIに結合することを示したが、今回本研究で用いたNEAbはドメインIIIに、またEAbはドメインIに結合することが明らかにされた。

EAbがIgG1アイソタイプであり、NAbがIgG3であるため、デング抗体の活性を規定するものとして、アイソタイプの関与が考えられる。そこで、抗体エンジニアリングにより、同一のFabを用いて、アイソタイプが種々のマウスIgG (IgG1, IgG2a, IgG2b 及びIgG3) である抗体を作製した。補体との親和性の低いIgG1が増強活性のみを示す傾向にあるのに対して、IgG3は中和活性のみを示す傾向にあった。したがって、アイソタイプはデング抗体の活性を規定する因子の1つである。しかしながら、エピトープも重要な因子と考えられる。それは、エピトープにより誘導されるIgGの主要アイソタイプが異なるからである。例えば、デング2型ウイルスやデング4型ウイルスでは、免疫方法が同じでも得られるMAbはIgG2aやIgG2bのNEAbが多くIgG1は中和活性や増強活性を示さないのに対して、デング1型ウイルスやデング3型ウイルスではIgG1のEAbが比較的多く得られる (データ示さず)。デング1型ウイルス望月株単独に注目しても、D1-V-3H12やD1-IV-3B8が対応するエピトープはIgG1を誘導する傾向が高いのに対し、今回は示さなかったがNEAbの他のグループに含まれるMAbはほとんどがIgG2aであり、このエピトープはIgG2aを誘導する傾向が高い。したがって、エピトープもデング抗体の活性を規定する因子となりうる。

エピトープ解析は現在世界で精力的に進められており、今後の安全なデングワクチンの開発に向けて、EAbが対応するエピトープを明らかにしていくことは重要と考え

られる。

E. 結論

デング1型ウイルスに対するNEAbはE蛋白のドメインIIIに、またEAbはドメインIに結合することを明らかにした。抗体エンジニアリングの手法によりアイソタイプが抗体の活性を規定する重要な因子であることを示したが、エピトープの関与も示唆した。

F. 健康危険情報

特記すべき事項なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

Eiji Konishi and Yamato Takizawa: Effect of pre-existing immunity to flaviviruses on balanced induction of neutralizing antibodies by a dengue tetravalent DNA vaccine in mice. *J Vaccin Vaccinat.* 1, 1000102, 2011, (DOI 10.4172/2157-7560.1000102)

Eiji Konishi, Yuko Miyagawa: Balance of infection-enhancing and neutralizing antibodies induced by a dengue tetravalent DNA vaccine in a mouse model. *Microbes and Infection.* 13(12-13):1091-8, 2011

Eiji Konishi and Mayu Konishi: Nonstructural protein 1 antibody-based epitope-blocking enzyme-linked immunosorbent assay to differentiate Japanese encephalitis virus from dengue virus infections in humans. *Japanese Journal of Infectious Diseases.* 64(4):284-91, 2011

Eiji Konishi: Issues Related to Recent

Dengue Vaccine Development. Tropical Medicine and Health. Advance Publication Article, 6 Aug 2011

Atsushi Yamanaka, Kris Cahyo Mulyatno, Helen Susilowati, Eryk Hendrianto, Amor P. Ginting, Dian Dwi Sary, Fedik Abdul Rantam, Soegeng Soegijanto and Eiji Konishi: Displacement of the Predominant Dengue Virus from Type 2 to Type 1 with a Subsequent Genotype Shift from IV to I in Surabaya, Indonesia 2008-2010. PLoS One. 2011;6(11): e27322. Epub 2011 Nov 7.

石川 知弘、小西 英二：フラビウイルス、「ウイルス」61巻2号、221-238、2011

Kris Cahyo Mulyatno, Atsushi Yamanaka, Ngadino and Eiji Konishi: Resistance of Aedes aegypti larvae to temephos insecticide in Surabaya, Indonesia. Southeast Asian J Trop Med Public Health. 43:29-33. (2012).

Kris C. Mulyatno, Helen Susilowati, Atsushi Yamanaka, Soegeng Soegijanto, Eiji Konishi: First isolation and phylogeny of Chikungunya virus from Surabaya, Indonesia. Jpn J Infect Dis. 65, 92-94 (2012).

小西英二：デングワクチン。「日本臨床」69巻9号、1617-1621頁、2011。

小西英二：デング熱とワクチン開発。「Pharma Medica」29巻4号、49-52頁、2011。

2. 学会発表

桑原三和、窪田衣里子、斎藤直輝、永菅尚、高橋裕輔、中村匡崇、山地秀樹、小西英二：

JEV抗原を高発現する昆虫細胞の樹立と産生抗原のワクチンへの適用。第45回日本脳炎ウイルス生態学研究会、2011年5月

小瀧将裕、武田祥子、小西英二：デング1型および3型マウスモノクローナル抗体の中和活性および増強活性を規定する因子の解析。第45回日本脳炎ウイルス生態学研究会、2011年5月

Atsushi Yamanaka, Kris Cahyo Mulyatno, Helen Susilowati, Eryk Hendrianto, Amor P. Ginting, Dian Dwi Sary, Fedik Abdul Rantam, Soegeng Soegijanto and Eiji Konishi: Displacement of the predominant dengue virus in Surabaya, Indonesia: status in 2008-2010.第59回日本ウイルス学会学術集会、2011年9月

Eiji Konishi, Yoko Kitai, Koichi Nishimura, and Seiya Harada: Natural infection with Japanese encephalitis virus in inhabitants of Kumamoto Prefecture, Japan, from 2004 through 2010. 第59回日本ウイルス学会学術集会、2011年9月

Tomohiro Kotaki, Shoko Takeda, Eiji Konishi: Monoclonal antibodies to dengue virus types 1 and 3 exhibit neutralizing and enhancing activities depending on epitopes on envelope protein and subclass of IgG. 第59回日本ウイルス学会学術集会、2011年9月

Hideki Yamaji, Takashi Nagasuga, Yusuke Takahashi, Masataka Nakamura, Tomohisa Katsuda, Miwa Kuwahara, and Eiji Konishi: Efficient production of extracellular subviral particles of Japanese encephalitis virus by

recombinant insect cells. 第59回日本ウイルス学会学術集会、2011年9月

Miwa Kuwahara, Hideki Yamaji and Eiji Konishi: Evaluation of extracellular subviral particles of dengue type 2 virus produced by insect cells for use as vaccine and diagnostic antigens. 第59回日本ウイルス学会学術集会、2011年9月

Atsushi Yamanaka, Helen Susilowati, Kris C. Mulyatno, Soegeng Soegijanto, Eiji Konishi: Isolation of chikungunya virus from patients clinically diagnosed as dengue fever in Surabaya, Indonesia, 2010. 第52回日本熱帯医学会大会、2011年11月

Atsushi Yamanaka, Kris Cahyo Mulyatno, Subagyo Yotopranoto, Helen Susilowati, Eiji Konishi: Vertical transmission of dengue virus in *Aedes aegypti* collected in Surabaya, Indonesia 2008 – 2009. 第52回日本熱帯医学会大会、2011年11月

桑原三和、北井陽子、近藤高志、小西英二：ウマを対象とした2006-2010年におけるウエストナイルウイルス国内侵入の監視。第52回日本熱帯医学会大会、2011年11月

桑原三和、小西英二：昆虫細胞を用いた Dengue 2 型タンパクワクチンの作製と評価。第15回日本ワクチン学会学術集会、2011年12月

Atsushi Yamanaka, Eryk Hendrianto, Kris C. Mulyatno, Helen Susilowati, Amor P. Ginting, Dian D. Sary, Soegeng Soegijanto and Eiji Konishi. Complement levels correlated with disease severity in dengue patients in Indonesia.

Asian-African Research Forum on Emerging and Reemerging Infections 2012. Kobe, Japan. January, 2012.

Soegeng Soegijanto, Helen Susilowati, Atsushi Yamanaka, Eiji Konishi. Unusual Manifestation of Dengue Virus Infection and its Management. Asian-African Research Forum on Emerging and Reemerging Infections 2012. Kobe, Japan. January, 2012.

Kris Cahyo Mulyatno, Atsushi Yamanaka, Subagyo Yotopranoto, Helen Susilowati, Eiji Konishi. Vertical transmission of dengue virus in *Aedes aegypti* collected in Surabaya, Indonesia 2008 – 2011. Asian-African Research Forum on Emerging and Reemerging Infections 2012. Kobe, Japan. January, 2012.

Helen Susilowati, Atsushi Yamanaka, Kris C. Mulyatno, Soegeng Soegijanto, Eiji Konishi. Isolation of chikungunya virus from patients clinically diagnosed as dengue fever in Surabaya, Indonesia, 2010 – 2011. Asian-African Research Forum on Emerging and Reemerging Infections 2012. Kobe, Japan. January, 2012.

Eriko Kubota, Miwa Kuwahara Hideki Yamaji and Eiji Konishi. Construction of a dengue type 4 extracellular subviral particles using a High Five expression system. Asian-African Research Forum on Emerging and Reemerging Infections 2012. Kobe, Japan. January, 2012.

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表 1. 本研究で使用した抗体のアイソタイプと中和・増強活性

| 抗体 グループ | 抗体名 | アイソ タイプ | 中和活性 | | 増強活性 (%) * | |
|------------|------------|------------|-----------|-----------|------------|-----------|
| | | | 補体なし | 補体あり | 補体なし | 補体あり |
| NEAb | D1-IV-1C8 | IgG2b | 1:80 | 1:80 | <u>51</u> | 0 |
| | D1-V-8E8 | IgG1 | 1:40 | 1:40 | <u>97</u> | <u>81</u> |
| | D1-I-11G12 | IgG1 | nt** | 1:40 | <u>82</u> | <u>78</u> |
| EAb | D1-V-3H12 | IgG1 | nt | <1:10 | <u>91</u> | <u>93</u> |
| | D1-IV-3B8 | IgG1 | nt | <1:10 | <u>93</u> | <u>93</u> |
| NAb | D1-IV-7F4 | IgG3 | 1:100,000 | 1:200,000 | 0 | nt |

*下線は有意の増強活性を示す。

** not tested.

表 2. エスケープミュータントにおける塩基及びアミノ酸の変異

| 抗体 グループ | ミュータント 作製に使用 した抗体 | 変異 | | |
|------------|-------------------------|---------|--------|------|
| | | 塩基 | アミノ酸 | ドメイン |
| NEAb | D1-IV-1C8 | 1813A→G | 325K→E | III |
| | D1-V-8E8 | 1813A→G | 325K→E | III |
| | D1-I-11G12 | 1813A→G | 325K→E | III |
| NAb* | D1-IV-7F4 | 1286A→G | 118K→E | II |

*昨年度の報告書に記載。

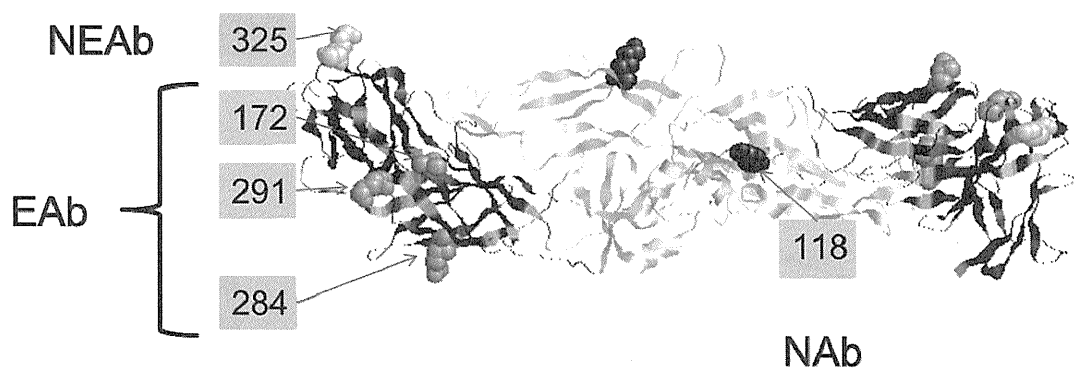


図 1. デングウイルス E 蛋白のリボンダイアグラム。エスケープミュータントにおけるアミノ酸変異の位置及び EAb のエピトープと推定されるアミノ酸位置を示した。ドメイン I (赤)、ドメイン II (黄)、ドメイン III (青)。