

## E. 結論

今回、千葉県、富山県、沖縄県、福岡県、石川県、新潟県、北海道で採集された10系統のトコジラミに対して、ピレスロイド剤のペルメトリンとフェノトリン、有機リン剤のディクロルボスとフェニトロチオン、カーバメイト剤のプロポクスル油剤の感受性を試験した。「千葉系」がピレスロイド系のフェノトリンに対して超高度の抵抗性を示し、次いで「沖縄那覇系」が高い抵抗性を示した。ペルメトリンに対しては「沖縄那覇系」が高い抵抗性を示し、「千葉系」、「新潟長岡系」が続いた。一方、「富山08系」、「北海道旭川系」は低度の抵抗性であることが明らかになった。全般的には各地のトコジラミともピレスロイド剤では確実な駆除は望めないと思われる。有機リン剤とカーバメイト剤に対しては低度の抵抗性が認められるが、丁寧な散布を行うことで駆除は可能と考えられる。さらに、ディクロルボス樹脂蒸散剤の利用や「熱殺法」を組み合わせることで、より安全で確実な駆除が可能になるとと思われる。

## F. 健康危険度情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

渡辺 護. 2010. トコジラミの復活, 駆除は難しい. 環動昆, 21:187-193.

渡辺 護. 2010. トコジラミの殺虫剤感受性と熱殺法の検討. 衛生動物, 61:239-244.

渡辺 護. 2010. トコジラミの復活, 確実な駆除を目指して. 環境管理技術, 29:27-37.

山内健生・奥嶋雄一. 2010. 倉敷市の一般家庭で発生したトコジラミ刺症. 家屋害虫, 32:77-78.

### 2. 学会発表

渡辺 護・谷口敬敏・山内健生. 2010. トコジラミに対する熱殺法の検討. 第62回衛生動物学会東日本大会, 2010年10月16日, 千葉県佐倉市.

渡辺 護. 2010. トコジラミ被害の現状と駆除の難しさ (教育講演). 第66回寄生虫学会西日本大会, 2010年11月6日, 岡山県岡山市.

渡辺 護・谷口敬敏・山内健生. 2010年に国内数箇所では採集したトコジラミの殺虫剤感受性. 衛生動物学会第64回大会発表予定, 2012年3月29-31, 上田市.

## H. 知的財産の出願・登録状況

### 1. 特許取得

なし

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

なし

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)  
分担研究報告書

コガタアカイエカからの日本脳炎ウイルスおよび新規ラブドウイルスの分離

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 鎌田龍星・伊澤晴彦・星野啓太・津田良夫・佐々木年則 (同・昆虫医科学部)  
山川 睦・梁瀬 徹 (動物衛生研究所九州支所ウイルス部門)  
比嘉由紀子(長崎大学熱帯医学研究所・病害動物学部門)  
Arlene G. Bertuso (Parasitology, University of the Philippines, Manila)

研究要旨

2009年5月ー8月, 国内6県およびフィリピン Bustos 州で捕集された蚊から JEV の分離を試み, 鹿児島県下の豚舎周辺で捕集されたコガタアカイエカ 1 プールから JEV が分離・検出された. 分離株の遺伝子解析から, 本分離株は, 近年東アジア地域で多く見いだされる I 型に属し, Envelope 領域の塩基配列情報ならび 3' 非翻訳領域の可変領域に見られる欠損パターンから, 2007 年の分離株により近縁であることが示唆された. 一方, 国内で捕集されたコガタアカイエカからラブドウイルス科に属する新規 RNA ウイルス (*Culex tritaeniorhynchus rhabdovirus*, CTRV と命名) を分離した. ウイルスゲノムの全塩基配列を決定し, ウイルス学的性状解析を行った結果, 本ウイルスは, 棒状の特異な粒子形態を持ち, 自身のゲノム中にスプライセオソーム型のイントロンを有し, 宿主の RNA スプライシング機構を利用して成熟 mRNA を発現するという, これまでに全く例のない新規のラブドウイルスであることが判明した.

A. 研究目的

世界では, 日本脳炎やデング熱などの蚊媒介性ウイルス(アルボウイルス)感染症が流行しており, それらの自然生態や流行動態の把握は, 予防対策上, 極めて重要である. 我が国におけるウイルス保有蚊調査は, コガタアカイエカの日本脳炎ウイルス(JEV)調査に代表されるが, その他のアルボウイルスを対象とした網羅的な調査は, これまでほとんど行われてきていない. 我々は, 2003 年より国内捕集蚊からのウイルス分離調査を継続して行い, これまでに JEV をはじめ, 複数の新規ウイルスを分離し報告してきた (CxFeV: Hoshino *et al.*, 2007, AeFV: Hoshino *et al.*, 2009, OMRV: Isawa *et al.*, 2011, AgFV: Hoshino *et al.*, 2012).

本研究では, 近隣諸国からのアルボウイルス

ス流行情報を得るために, これまで行ってきた国内調査に加え, フィリピンマニラ市近郊でも同様に調査を行った. 次いで, JEV の主要媒介蚊であるコガタアカイエカから新規のラブドウイルス (*Culex tritaeniorhynchus rhabdovirus*, CTRV と命名, Kuwata *et al.*, 2011) を分離したので, そのウイルス学的諸性状も併せて報告する.

B. 研究方法

1. 蚊の捕集

CDC 型ドライアイストラップ, 捕虫網および吸血管を用いて蚊を捕集した. 2009 年 5ー8 月に国内 6 県(山形, 福井, 兵庫, 滋賀, 徳島, 鹿児島県)の畜舎周辺, およびフィリピンマニラ市近郊 Bulacan 州 Bustos の豚舎において同年 7 月より定期的に蚊の捕を行った.

CTRV が分離されたコガタアカイエカは、千葉県千葉市の牛舎で吸虫管により捕集した。

## 2. ウイルス分離

捕集蚊は、捕集地および捕集日ごとに最高 20 個体までを 1 プールとし、MEM 培養液中で細胞破砕機 MM300 (QIAGEN) を用いて破砕し、ウイルス分離用乳剤を調整した。乳剤を蚊由来培養細胞 C6/36 に接種し、28°C、5% CO<sub>2</sub> 条件下で 7 日間培養した。その後、同条件下で 2 代盲継代培養を行った。

## 3. 遺伝子解析

細胞変性効果 (CPE) が確認された最終ウイルス培養上清から Viral RNA Extraction Kit (QIAGEN) を用いて RNA を抽出した。JEV 遺伝子の検出は real-time PCR (TaqMan 法) (Shirato et al., 2005) により行い、遺伝子陽性プールについては、E 領域および 3'非翻訳領域 (3'UTR) の遺伝子解析を行った。使用したプライマーは、E 領域特異的プライマー 3 組、3'UTR 特異的プライマー 1 組 (Hoshino et al., 2007, Hoshino et al., 2009) である。得られた PCR 産物は、ABI PRISM 3100-Avant Genetic Analyzer を用いてダイレクトシーケンシング法でヌクレオチド配列を決定し、GENETYX software (Genetyx Corp., Tokyo, Japa) および Basic Local Alignment Search Tool (BLAST, エラー! ハイパーリンクの参照に誤りがあります。BLAST/) を利用して解析した。

CTRV ゲノムの解析は、RT-PCR により遺伝子を増幅し、その全塩基配列を決定した。ゲノム両末端配列は RACE 法により決定し、全塩基配列より推定された 5 つのウイルス遺伝子 (N, P, M, G, L) の各転写開始点および終了点を RACE 法により同定した。また、Strand-specific RT-PCR ならびに Northern hybridization により L 遺伝子の遺伝子発現機構を検証した。

JEV, CTRV それぞれの既知および近縁ウイルスの塩基配列をデータベースより抽出し、近隣結合法による系統解析を行った。

## 4. CTRV の性状解析

感染細胞内におけるウイルス RNA の局在を調べるために、CTRV 感染 C6/36 を 4% パラフォルムアルデヒドで固定し、CTRV ゲノム用 RNA プロブを用いて *in situ* hybridization を行った。

ウイルス粒子形態観察のために、ウイルス培養上清を 4°C で 1,600g×15 分、上層をさらに 4°C で 12,000g×30 分間遠心し、調整したウイルス液を 4°C で 77,000g×2 時間遠心した。バッファーで懸濁した沈澱を 2% グルタルアルデヒドで固定し、2% 酢酸ウラニルによりネガティブ染色を行い、透過型電子顕微鏡下で観察した。

蚊由来 C6/36 細胞、哺乳動物由来 Vero 細胞 (アフリカミドリザル腎臓由来) および BHK21 細胞 (ハムスター腎臓由来) における CTRV の増殖性を調べるために、各培養細胞に CTRV を接種し、3 代盲継代後の培養上清から RNA を抽出し、特異的プライマーを用いた RT-PCR により遺伝子を検出した。

## C. 結果

### 1. 野外捕集蚊からの JEV 分離

2007 年以降継続して調査している鹿児島県南九州市の豚舎周辺で、9 月に捕集した蚊プールから JEV が 1 株分離された。プール陽性率は 1.7%、MIR は 0.85 と推定された。2009 年のブタの HI 抗体保有状況調査 (日本脳炎速報, 国立感染症研究所感染症情報センター) では、9 月上旬には鹿児島県を含む九州全域で HI 抗体保有率は 90% 以上を示した。徳島県でも 7 月下旬には 90% 以上になったが、6-8 月のいずれの捕集蚊からも JEV は分離されなかった。

E 遺伝子のアミノ酸配列を基に作成した系

統樹から、2009年の分離株は、近年、東アジア地域および日本を中心に分離されているI型分離株と遺伝的に極めて近縁であるが、多くの2007年分離株と同じクラスターに属していた。500アミノ酸のうち5アミノ酸(1%)に変異が見られた。例えば、E123番目(SとN)、E261(GとS)、E295(AとT)、E339(IとV)、E366(SとP)の違いが認められた。一方、ゲノム中の3'UTRの翻訳停止コドン下流の可変領域に、2塩基、13塩基、1塩基の配列欠損が近年のI型分離株には共通して認められるが、それ以外にも特徴的な欠損部位の存在が示された。2009年鹿児島県分離株の3'UTRにおける特徴は、近年の分離株の典型的な欠損パターンを示していた。

フィリピンBulacan州Bustosにおける定期的な蚊捕集調査から、コガタアカイエカをはじめ、東南アジア諸国でJEVの媒介種とされるイエカ類(*Cx. pseudovishnui*, *Cx. gelidus*, *Cx. vishnui*, *Cx. fuscocephala*)、および*Cx. quinquefasciatus*が多数捕集された(合計6属13種2,648頭)。しかし、これまでにウイルス分離を行った137プール中、13プールにCPEが観察されたが、JEVは分離されなかった。

## 2. コガタアカイエカから分離されたCTRV

CTRVのゲノムは11,190 ntのRNAで、ゲノム上には5つのウイルスタンパク質(N-P-M-G-L)に対応する各遺伝子が同様の順序でコードされていた。CTRVゲノムの両末端には、パンハンドル構造をとる相補的塩基配列が認められた。分子系統解析の結果、CTRVは既知のラブドウイルスとは離れた類縁関係にあり、現時点では、ラブドウイルス科のいずれの属にも属しないと考えられた。CTRV各遺伝子の5'側、3'側末端にそれぞれAACAUとUGAAAAAAAのコンセンサス配列が認められたことから、CTRVの各遺伝子は、これら転写開始および終了シグナルにより制御されていることが推察され

た。G遺伝子の終点付近とL遺伝子の始点付近は一部重複していることから、CTRVのL遺伝子の発現制御に関わる可能性が示唆され、CTRVのL遺伝子にはスプライセオソーム型のイントロン(76 nt)の存在も明らかになった。

Strand-specific RT-PCRならびにNorthern hybridizationにより、CTRVは転写の過程で宿主のRNAスプライシング機構を利用して遺伝子発現を行うことが示唆された。*in situ* hybridizationの結果からは、感染細胞において、CTRVゲノムの-鎖(=ゲノムRNA)は核に局在し、+鎖(=アンチゲノムRNA, mRNA)は核および細胞質に局在することが判明し、CTRVは専ら宿主感染細胞の核内で複製・転写を行うことが示唆された。さらに、CTRVの表面構造および内部構造は既知のラブドウイルスに類似しているものの、その形態は、典型的な砲弾状ではなく、極端に長い棒状であることが判明し、蚊由来C6/36細胞ではCTRVの増殖が認められたものの、哺乳動物由来Vero細胞およびBHK21細胞ではCTRVの増殖は確認されなかった。

## D. 考察

### 1. 野外捕集蚊からのJEV分離

我々の2009年までの5年間の調査の中で、長崎県で4年、鹿児島県で3年続けて、それぞれ同じ場所で蚊の捕集を行い、JEV遺伝子の変異を追跡した結果、2007年に新たな変異株が現れたことが示唆された。しかし、鹿児島県においては2007年の変異株だけでなく、2008年分離株のように従来のタイプも存在しており、長崎県においても同様の傾向が認められた。九州地方、特に長崎県、鹿児島県の両県は、農業害虫を含む昆虫類の海外からの飛来侵入が示唆されている地域であることから、JEVが海外よりもたらされた可能性が強く示唆された。今後も鹿児島県においては継続して調査し、蚊およびJEVの海外からの侵入につ

いても検討していきたい。

JEVの海外よりの侵入と分散を考える上で海外調査の重要性が示唆されたことから、2009年よりフィリピンマニラ市近郊のBulacan州Bustosを定点として同様のウイルス保有調査を行った。フィリピンにおける蚊の種構成、あるいは季節消長などの基礎的な情報はもとより、JEV分離に関する情報はほとんど報告されていない。現在までにBustos捕集蚊からJEVは分離されていないが、CPEが得られた蚊プールは13プール存在し、JEV以外のウイルスが分離・検出される可能性が示唆されている。媒介蚊ならびにウイルスの両面から本研究を継続する意義は高く、その成果の蓄積は、将来重要な情報となることが期待される。

## 2. コガタアカイエカから分離された CTRV

日本脳炎ウイルスを媒介するコガタアカイエカからこれまでに報告のない新規ラドウイルス(CTRV)が分離・発見された。本ウイルスの哺乳動物由来培養細胞でのウイルス増殖は明確には認められなかったが、CTRVがある種の脊椎動物への感染性を有するアルボウイルスである可能性も視野に入れ、その自然生態や宿主域などを詳細に検討する必要がある。

CTRVは転写の過程において、宿主のRNAスプライシング機構を利用して遺伝子発現を行うことが明らかになり、ラドウイルスにおいてもスプライシング依存型の遺伝子発現機構が存在することが初めて確認された。G遺伝子との重複も併せて、CTRVのL遺伝子発現は高度に制御されていると考えられる。また、CTRVは宿主細胞の核内で遺伝子の複製・転写を行うことも示唆された。一方で、RNAウイルスにとっては、感染細胞内において、細胞質よりも核にゲノムを移行する方が、宿主の自然免疫応答を回避する点で有利である可能性も考えられる。同時に、RNAウイルスにとってゲノムを宿主細胞の核内に持ち

込むことは、次代へのウイルスゲノムの移行の点で有利となる可能性も考えられる。RNAウイルスの構成タンパク質には核移行シグナルを含むものが多く存在するが、その生物学的意義は不明な点が多い。CTRVにおけるウイルスゲノムの核移行の意義やメカニズムの解明は、RNAウイルスの進化を考える上でも非常に重要である。

## E. 結論

- 1) 2009年南九州市で捕集したコガタアカイエカから分離されたJEVは、E領域および3'UTRの特徴から、近年東アジア地域で多く見いだされるI型に属し、2007年分離株により近縁であることが示唆された。
- 2) フィリピンBulacan州Bustosにおいて捕集された蚊(合計6属13種2,648頭)のうち、これまでに137プールをウイルス分離に供し、13プールにCPEが観察されたが、JEVは分離されなかった。
- 3) 千葉市の畜舎で捕集されたコガタアカイエカから新規ラドウイルス(CTRV)が分離され、そのウイルスゲノムは11,190 ntのRNAで、ゲノム上に5つのウイルスタンパク質をコードする遺伝子(N-P-M-G-L)がコードされていた。
- 4) CTRVは感染細胞の核内で複製・転写を行うことにより、宿主のRNAスプライシング機構を利用して遺伝子発現を行う、前例のないラドウイルスであることが判明した。
- 5) CTRVの粒子は極端に長い棒状を呈し、蚊由来C6/36細胞では増殖が認められたが、哺乳動物由来Vero細胞およびBHK21細胞での増殖は認められなかった。

謝辞：蚊の捕集ならびにそれらからの病原

体の分離と検出を実施するにあたり、以下の方々にご協力をいただいたので、ここに深謝する(敬称略)。福永哲也・鮫島弘和(鹿児島県南薩家畜保健衛生所)、堀内早苗(宮崎家畜場)、一木智子・中尾美樹(九州大学農学部)、高崎智彦・小滝徹・倉根一郎(国立感染症研・ウイルス第1部)、Myra S. Mistica (Parasitology, University of the Philippines, Manila)。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表:

1) Hoshino, K., Takahashi-Nakaguchi, A., Isawa, H., Sasaki, T., Higa, Y., Kasai, S., Tsuda, Y., Sawabe, K., Kobayashi, K. (2012) Entomological surveillance for flaviviruses at migratory bird stopover sites in Hokkaido, Japan, and a new insect flavivirus detected in *Aedes galloisi* (Diptera: Culicidae). *Journal of Medical Entomology*, 49: 175–182.

2) Kuwata, R., Isawa, H., Hoshino, K., Tsuda, Y., Yanase, T., Sasaki, T., Kobayashi, M., and Sawabe, K. (2011) RNA splicing in a new rhabdovirus from *Culex* mosquitoes. *Journal of Virology*, 85: 6185–6196.

3) Isawa, H., Kuwata, R., Hoshino, K., Tsuda, Y., Sakai, K., Watanabe, S., Nishimura, M., Satho, T., Kataoka, M., Nagata, N., Hasegawa, H., Bando, H., Yano, K., Sasaki, T., Kobayashi, M., Mizutani, T., Sawabe, K. (2011) Identification and molecular characterization of a new nonsegmented double-stranded RNA virus isolated from *Culex* mosquitoes in Japan. *Virus Research*, 155: 147–155.

##### 2. 学会発表:

1) 鋏田龍星・伊澤晴彦・星野啓太・佐々木年則・津田良夫・金京純・梁瀬徹・白藤浩明・山川睦・今田忠男・小林睦生・澤邊京子。

2009年国内捕集コガタアカイエカの日本脳炎ウイルスの保有調査。第62回日本衛生動物学会大会, 鹿児島市, 2010年4月2–4日。

2) 鋏田龍星, 伊澤晴彦, 星野啓太, 佐々木年則, 津田良夫, 金京純, 小林睦生, 沢辺京子。国内捕集コガタアカイエカから分離された新規ラブドウイルスの性状解析。第62回日本衛生動物学会, 第62回日本衛生動物学会大会, 鹿児島市, 2010年4月2–4日。

3) 澤邊京子・鋏田龍星・星野啓太・伊澤晴彦・佐々木年則・比嘉由紀子・津田良夫・Nguyen Thi Yen・Phan Thi Nga・高木正洋・小林睦生。2006–2008年ベトナムにおける日本脳炎ウイルスおよび媒介蚊調査。第62回日本衛生動物学会大会, 鹿児島市, 2010年4月2–4日

#### 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

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)  
分担研究報告書

Culex flavivirus 感染性 cDNA クロンの構築

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・鍬田龍星・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。さらに近年、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ぎ、その多様性や宿主蚊特異性が注目されてきている。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ようになってきた。

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 (Hoshino *et al.*, 2007)。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。宿主大腸菌には DH5 $\alpha$  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), 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. 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. この培養上清から RNA を抽出し, CxFV 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. 以上の結果から, CxFV 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.

### 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シ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 CxFV 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 CxFV 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, CxFV 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

厚生労働科学研究補助金（新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業）  
分担研究報告書（平成 21 年-23 年）

カが媒介するデングウイルス、日本脳炎ウイルス、ウエストナイルウイルス、  
チクングニアウイルス検出の試み

研究分担者 柴田 伸一郎（名古屋市衛生研究所 主任研究員）

研究協力者 小平 彩里（名古屋市衛生研究所 研究員）

### 研究要旨

節足動物により媒介されるウイルス性疾患は、ダニやカにより媒介されるものが知られている。これらのウイルスをアルボウイルスと称している。アルボウイルス（英: arbovirus）は、節足動物内で増殖し、それらの吸血活動によって脊椎動物に伝播されるウイルスの総称であり、節足動物体内での増殖を伴うものを指す。アルボウイルスには、トガウイルス科アルファウイルス属の東部馬脳炎ウイルス、西部馬脳炎ウイルス、ベネズエラ馬脳炎ウイルス、チクングニアウイルスが、フラビウイルス科フラビウイルス属では、デングウイルス、黄熱ウイルス、日本脳炎ウイルス、ウエストナイルウイルス、セントルイス脳炎ウイルス、マレーバレー脳炎ウイルス、ロシア春夏脳炎ウイルス、中央ヨーロッパダニ媒介性脳炎ウイルス、オムスク出血熱ウイルス、キャサヌール森林熱ウイルス、跳躍病ウイルスがそしてブニヤウイルス科では、ラクロスウイルス、クリミアコンゴ出血熱ウイルス、リフトバレー熱ウイルスなどがある。

これらウイルスの中で、国内に媒介節足動物の存在し、国際交流・経済交流で密接な関係な地域に流行が見られるウイルスの日本への侵入が恐れられている。具体的には、日本に存在する日本脳炎ウイルスを除くと、2000 年以降米国で流行が見られているウエストナイルウイルス、さらには東南アジア諸国からの輸入が多いデングウイルス、近年東南アジアで急拡大中のチクングニアウイルスなどである。

平成 21 年度の本研究でチクングニアウイルス検出法開発し、さらに平成 22 年度からはリアルタイム RT-PCR 法を用いてカからのチクングニアウイルス、RT-PCR 法でウエストナイルウイルス、日本脳炎ウイルス検出を試みた。平成 23 年度は 1 型から 4 型までの血清型の存在するデングウイルス検出法の効率を上げることを目的として、検査法の改良を行い、デングウイルス 1 型から 4 型遺伝子型検出を同一ウエル内で一度に検出できるマルチプレックスリアルタイム PCR 法を開発した。この方法でデングウイルス 1 型から 4 型それぞれのウイルス RNA に対しての検出に対応できることが分かった。

そこで平成 23 年度は、名古屋市内でドライアイストラップ法あるいは 8 分間人囿法により捕獲したカに対してそれぞれの検査法を用い、チクングニアウイルス、デングウイルス、

ウエストナイルウイルス、日本脳炎ウイルスの遺伝子検出、あるいは C6/36 細胞から Vero 細胞への継代によるウイルス分離を試みた。

平成 21 年度から 23 年度にかけてのカからのウイルス検出で、平成 22 年に 1 株の日本脳炎ウイルスをマウスを用いて分離し、2 株の日本脳炎ウイルス遺伝子を検出した。これらの日本脳炎ウイルス遺伝子が、名古屋市内のカから検出されたのは貴重なデータである。

## A. 研究目的

衛生研究所は、検疫所と並び感染症対策の重要な拠点である。日本国内に常在しないウイルスの国内侵入に対して常時監視をする必要があり、人に対しては全国 76 ヶ所ある地方衛生研究所と国立感染症研究所がネットワークを作り感染症発生動向調査病原体検索事業により日本国内のウイルス感染症の発生動向を追跡している。しかし、このネットワークでとらえることができるのは、人が感染し発症して報告がなされてからである。また、正確な診断がなされないとチクングニア熱、デング熱などは見逃されてしまう例もある。また、チクングニア熱、デング熱は症状が類似している点もあり鑑別診断が必要である。そのためにもウイルス検出法の確立は必須である。

また、ウエストナイル熱は 2000 年から米国内での流行が始まり、2005 年 9 月には国内への輸入症例が報告された。2007 年にはロシアのボルゴグラード州にてウエストナイル熱が発生し、2011 年までに東ヨーロッパ、地中海域でもウエストナイル熱が発生している。このウエストナイル熱を引き起こすウエストナイルウイルスは、ヒトは終宿主で感染環はトリ→カ→トリであり、米国などの調査で渡り鳥がウイルスを運ぶことが確認されており、ヒトの監視だけでは片手落ちである。また、ロシアと日本とは地理的にも近く渡り鳥のルートもあること

から、国内持込みへの監視はカを検査が重要である。

我々は以前より名古屋市内で捕集した雌のカを乳剤にしてウエストナイルウイルス、日本脳炎ウイルス分離、遺伝子検出を実施してきた。

チクングニア熱は、平成 23 年 2 月より感染症法の 4 類感染症として指定された。チクングニアウイルスは、自然界では、カーサルーカ、カーヒトーカの感染環を持ち、アフリカ、インド、東南アジア諸国で、チクングニア熱が蔓延している。2007 年 7 月には、インドで感染した人によりイタリア北部農村でチクングニアウイルスが持ち込まれ、最終的には 334 名に感染疑い、204 名に感染が確認され、1 名が死亡するという集団感染が起こった。また、2010 年 9 月チクングニア熱のフランス国内での感染例が報告された。

日本にも媒介蚊であるヒトスジシマカがおり、その生息域が国土の 90% 近くを占めている。チクングニア熱の輸入症例数も 2006 年 11 月以降 19 例報告されており、いつイタリアやフランスのような国内での感染が起きても不思議ではない状態となっている。

デング熱に関しては、戦後日本で 20 万人もの患者を出したが、現在は国内にウイルスは存在しない。しかし媒介蚊であるヒトスジシマカは国内に広く分布しており、再

びデングウイルスが国内に常在化する危険をはらんでいる。

そこで、我々は以前より存在する日本脳炎ウイルス、そして媒介カが存在し、輸入感染症として国内に常在しかねないチクングニアウイルス、デングウイルス、ウエストナイルウイルスの調査を名古屋市内で捕集したカに対して極力省力化し実施する方法を模索した。

## B. 研究方法

平成 22 年度は、7 月から 11 月の期間で名古屋市内の 34 地点延べ 104 地点から名古屋市生活衛生センター職員が、8 分間人囮法によりカを捕獲した。捕獲された雌ヒトスジシマカは 1784 頭、103 プールであった。平成 23 年度はドライアイストラップ法により 11 地点延 116 地点で 5 月から 10 月までの期間でシナハマダラカ 2 頭、2 プール、ヒトスジシマカ 630 頭、62 プール、アカイエカ群 954 頭、88 プール、コガタアカイエカ 116 頭、9 プール、合計 1702 頭、161 プール、また 6 月から 9 月にかけて 8 分間人囮法により採取されたヒトスジシマカ♀は、869 頭、25 プールであった。平成 23 年度検査を実施したカは、総合計 2571 頭 186 プールとなった。

捕獲したカはドライアイスで処理し雌のカを採取地点毎に最大 50 頭を 1 プールとして 2.0ml スクリューキャップチューブに詰め冷凍したまま検査に供した。

凍結したカに冷凍したメタルコーンと 1ml の冷却した MEM を加え、マルチビーズショッカー（安井機器）により破碎し乳剤化した。このチューブを冷却遠心機で 4℃、13,000 回転、10 分間遠心し、上清を 0.22

μポアフィルターで濾過をし、その濾液の一部は、24 ウエルマルチプレートに単層培養した C6/36 細胞を PBS で洗浄後、100 μl/ウエルの割合で 2 ウエル接種し、28℃ CO<sub>2</sub> インキュベーターで 1 時間吸着後、接種液を PBS で 1 回、2 倍量の非必須アミノ酸を添加した MEM (2xNEAA MEM) で 1 回洗浄後、1% ウシ胎児血清加 MEM (1% FBS MEM) で培養した。C6/36 細胞によるウイルス分離は、2 代継代後 Vero 細胞に継代し直し、37℃ 1 週間 CPE を観察した。CPE が認められない検体については、QIAamp Viral RNA Mini Kit を用い細胞培養上清より RNA 抽出を行い、各々のウイルス遺伝子検出を RT-PCR、マルチプレックスリアルタイム PCR を実施し確認した。

カ乳剤濾液の 140 μl は直接 QIAamp Viral RNA Mini Kit を使用して RNA 抽出をし、以下の遺伝子検査に使用した。

チクングニアウイルス遺伝子検出は、QuantiTect Probe RT-PCR Kit を使用して、本研究班員の高崎氏らが開発した TaqMan プローブリアルタイム RT-PCR 法を用いた。プローブ：TaqMan MGB Probe Taq-Chik638P : FAM-TACCAGCCTGCACYC-MGB-3' プライマー (F) : Taq-Chik607F (10849) : GCR CCM TCT KTA ACG GAC AT プライマー (R) : Taq-Chik672R (10894) : GCC CCC RAA GTC KGA GGA R の プライマー・プローブセットを用い以下の反応条件で実施した。逆転写反応 48℃ 30min.、PCR 酵素活性 95℃ 10min.、2steps PCR 95℃ 15sec. & 60℃ 1min. を 45 サイクル実施した。

日本脳炎ウイルス、ウエストナイルウイルスの遺伝子検出は、以下のコンベンショ

ナル RT-PCR の系を用いた。

cDNA 合成 : PrimeScript RT Reagent Kit (TakaraBio) に添付の仕様書に従い Oligo dT と Random 6 mers で 30µl の反応系で逆転写を実施した。得られた cDNA、5µl を用いて PCR 反応を実施した。

1st PCR は、プライマーペア WN Outer S: tgg atw gar gar aat gaa tgg at / WN Outer C : tccgaracrgtwyygagggctt で PrimeStar GXL DNA Polymerase (タカラバイオ) 98°C 10 秒、50°C 10 秒、68°C 60 秒の 3 ステップを 45 サイクル実施した。さらに Nested PCR は WN Inner S: gar gac aty tgg tgy gg / WN Inner C: cag gca gca ccg tmt rcy ca プライマーペアを用いて同様の反応条件で実施した。

デングウイルスも上記記載の cDNA2.0 µl を使用して QuantiTect Multiplex PCR Kit (QIAGEN) を用いてマルチプレックス PCR により、1 型から 4 型の検出を一度に実施した。

1 型 用 D1MGBEn469s : gaacatggracaaytgaacyat 、  
D1MGBEn536r : ccgtagctcdgtcagctgtatttca、  
D1MGBEn493pFAM- acacctcaagctcc  
-MGB、 2 型用 D2MGBEn493s :  
acaccacagagttccatcacaga 、  
D2MGBEn568r : catctcattgaagtenaggcc、  
D2MGBEn545p : NED- cgatggartgctctc  
-MGB 3 型 用 D3MGBEn1s :  
atgagatgygtgggagtrggaaac 、  
3MGBEn71r : caccacdtcaaccacgtagct、  
D3MGBEn27p VIC- agattttgtggaaggyct  
-MGB 、 4 型 用  
D4TEEn711s:ggtgacrttyaargthcctcat 、  
D4TEEn786r:wgartgcatrgctccyctctg 、

D4TEEn734p

ROX-

ccaagagacaggatgtgacagtgctrggac-BHQ を使用し、95°C 15 分、95°C 1 分、57°C 1 分 50 サイクルの PCR を実施した。

### C. 研究結果

デングウイルス遺伝子検出マルチプレックス PCR 系

デングウイルス検出用リアルタイム PCR 法では、FAM 一色の蛍光により 1 型から 4 型までを検出していたため 1 検体につき最低 4 種類の反応系を必要としていたため多検体検出を実施するには、時間と多くの試薬を必要とした。今回 1 型検出に FAM-MGB、2 型検出に NED-MGB、3 型検出に VIC-MGB、4 型検出に ROX-BHQ プローブを用いることにより、デングウイルス検査を従来の 1/4 の試薬量、検体は、4 倍処理することができるようになった。

ウイルス分離による成績

C6/36 細胞によるウイルス分離は、ウイルス接種後 1 週間 CPE の出現の有無を観察したが CPE は見られなかったため、1 代目の細胞を上清とともに凍結融解を行い 2 代継代した。さらに CPE を観察し、CPE が見られなかったウエルについては、細胞、上清とともに凍結融解を実施後、Vero 細胞に継代した。最終的に CPE の出現は認められず、デングウイルス、チクングニアウイルス、日本脳炎ウイルス、ウエストナイルウイルス等の分離はできなかった。

ウイルス分離上清、カ乳剤からのウイルス遺伝子検出

直接、もしくは、C6/36 細胞 2 代継代後

Vero細胞継代上清からの抽出RNAからは、日本脳炎ウイルスを除く、ウエストナイルウイルス、チクングニアウイルス、デングウイルス遺伝子は全く増幅が見られなかった。

日本脳炎、ウエストナイルウイルス検出RT-PCRで蚊検体直接の抽出RNAから日本脳炎ウイルス遺伝子が平成22年8月の検体から2件検出された。検体からダイレクトに遺伝子を検出した検体乳剤をサックリングマウスに接種し、一株日本脳炎ウイルス分離に成功した。

#### D. 考察

デングウイルス、チクングニアウイルス、日本脳炎ウイルス、ウエストナイルウイルスのウイルス分離、遺伝子検出、分離培養産物からの遺伝子検出を実施したが、日本脳炎ウイルスを除きこれらのウイルスを分離または遺伝子検出することはなかった。各々のウイルスの陽性コントロールRNAを使つての遺伝子増幅の確認により、検出系が機能していることを確認しているので、今回調査した名古屋市内で捕集されたカは、これらウイルスを保有していないことがわかった。しかしながら日本脳炎ウイルスが名古屋市内のカから分離されたことは興味深い。

#### E. 結論

デングウイルス、チクングニアウイルス、ウエストナイルウイルス、日本脳炎ウイルスこれらウイルスのうち日本に従前から存在している日本脳炎ウイルスを除いたそれぞれのウイルスは、日本にいつ侵入・定着するのかわからない状況である。実際、2005年9月にはウエストナイルウイルスの国内輸入例が発生した。また、デングウイルスは毎年のように国内に持ち込まれている。チクングニアウイルスも海外での感染者急増により国内に持ち込まれる事例が多数報告された。さらにこれらウイルスに感染し、増幅することのできるヒトスジシマカ等の生息域が日本国土の約90%を占めることを考慮すると、海外より持ち込まれたこれらのウイルスが日本に定着してもおかしくない状況である。今後もこれらウイルスやカの動向に注目していく必要性がある。

#### F. 研究発表

1. 論文発表
2. 学会発表

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得：なし
2. 実用新案登録：なし
3. その他：なし

## デングDNAワクチンがマウスに誘導する感染中和・増強抗体及び 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 デング熱及びデング出血熱は地球規模の疾患であるが、認可ワクチンはない。防御に重要な中和抗体を誘導できるワクチンが予防に有効であると考えられているが、中和抗体は低濃度では感染増強活性が生じるため、逆に重症化を導く懸念が指摘されるに至った。本研究では、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。平成 21 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、ワクチンは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。平成 22 年度は、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、中和活性のみあるいは増強活性のみを示す抗体の性状解析を行った。平成 23 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する可能性を示した。

### 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し、年間 5 千万から 1 億人の罹患者が推定される地球規模の蚊媒介性疾患である。しかし、認可ワクチンも特異的な治療法もない。現在の日本では輸入感染症として患者が発生するのみであるが、ネッタイシマカに次ぐデングウイルス (DENV) 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。

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。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ことも知られている。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。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行った。

### B. 研究方法

細胞 : Vero, C6/36, K562, U937 及び HL60 細胞を用いた。

ウイルス : DENV1 (望月株)、DENV2 (ニューギニア C 株)、DENV3 (H87 株) 及び DENV4 (H241 株) を用いた。

モノクローナル抗体 (MAb) : DENV1 あるいは DENV2 を免疫原として作製した、それぞれ 8 あるいは 10 種類のマウスモノクローナル抗体を用いた。

従来 of 感染増強試験 : 感染細胞率に基づく方法、ウイルス産生量に基づく方法及び感染中心数に基づく方法に基づいた。

マウス実験 : デング 4 価 DNA ワクチンを、ICR マウスに投与した。また移入実験では、

C3H/He マウスにモノクローナル抗体を尾静脈より接種した。

中和試験：Vero 細胞を用いて、50%または 90%プラーク減少法によった。

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 DENV を混合した。37°C で 2 時間保温後に、準接着系 K562 細胞を各ウェルに加えて 24～48 時間 37°C で培養した。固定後、免疫染色により感染細胞数を求めた。

抗体のアフィニティ精製及びビオチン化：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：DENV1 抗原感作プレートに、一次抗体、ビオチン化二次抗体を順次反応させ、一次抗体非添加ウェ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 感染 Vero 細胞を MAb 添加培養液で 7 日間培養し、これを 3～4 回繰り返した。また、EAb のエピトープマッピングは、前駆膜 (prM) とエンベロープ (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た後、この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 RNA を抽出し、抗体可変部の遺伝子を増幅し、シークエンス解析を行った。さらに、この遺伝子をマウス 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

中和・増強活性のバランス測定法の評価：従来法との比較：5B10 抗体を用いて 3 種の感染増強試験と比較した結果、簡便法と従来法から得られた用量依存曲線はほぼ同様のパターンを示した。中和試験への応用：10 種類のモノクローナル抗体を用いて比較した結果、K562 細胞と Vero 細胞で得られた中和抗体価は有意に相関した ( $p < 0.001$ )。

デング 4 価 DNA ワクチンが誘導する抗体：能動免疫マウスにおける抗体の経時変化：免疫初期の中和抗体がまだ十分に誘導されていない時期、あるいはドーズが低いために誘導される抗体レベルが低い条件では、感染増強活性が示された。しかし、この感染増強活性は、反応系に補体を添加することにより消失することが明らかとなった。モノクローナル抗体移入後の抗体の経時変化：ワクチン接種後に抗体レベルが徐々に低下する状態における中和及び感染増強活性の動態を調べるため、移入実験を行った。移入後、血清中の抗体濃度の経時的な減少に比例して、感染増強のピークは低希釈の方へシフトした。そして、10 倍希釈で示される中和活性が徐々に減少した。

DENV1 に対するモノクローナル抗体の中和・増強活性：デング 1 型 DNA ワクチンで免疫したマウスから樹立した MAb を用いて中和活性及び増強活性を調べた結果、中和活性及び低濃度で増強活性を示す通常の抗



体 (NEAb) 以外に、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。

従来の感染増強試験との比較 : D1-IV-7F4 (NAb) と D1-V-3H12 (EAb) を用いた結果、従来法においても NAb は中和活性のみを示し、EAb は増強活性のみを示した。

他の細胞種を用いて得られた中和・増強活性 : U937 細胞及び HL-60 を用いて中和・感染増強試験を行った結果、K562 細胞とほぼ同様の活性パターンを示した。

他の型のデングウイルスに対する中和・増強活性 : D1-V-3H12 は DENV1 に対して高濃度で増強活性を示したが、他の型に対しては高濃度では弱い中和活性を示し、中程度の濃度で増強活性を示した。D1-IV-9B1 では、いずれの型に対しても同様のパターンを示したが、補体非存在下における増強活性は DENV1 に対するよりも他の型に対するほうが強く示された。

ADE における  $Fc\gamma$  レセプターの関与 :  $Fc\gamma$  RIIa (CD32) に対する抗体で前処理した K562 細胞では、増強活性が抑制され、 $Fc\gamma$  レセプターの関与が示された。

競合試験とアイソタイプ : 3 種類の NEAb (D1-IV-1C8、D1-V-8E8、D1-I-11G12) は競合試験で相互に反応阻害を示し、ほぼ同一のエピトープを認識すると考えられた。2 種類の EAb (D1-V-3H12、D1-IV-3B8) も互いに反応阻害を示した。NEAb、EAb 及び NAb (D1-IV-7F4) は相互に反応阻害を示さず、エピトープは異なることが示された。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 : エスケープミュータントを作製した。3 種の NEAb は、い

れも E 蛋白の 325 番目のアミノ酸に変異を引き起こした。NAb については、118 番目のアミノ酸に変異を示した。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の存在が推定された。

アイソタイプが中和・増強活性バランスに及ぼす影響 : 抗体エンジニアリングにより、同一の Fab 配列 (D1-I-11G12 由来) 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た。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

$Fc\gamma$  R を有する K562 細胞を準接着系に改良し、簡便に中和・増強活性のバランスを測定する方法を開発した。この方法は、ポリクローナルな血清中抗体がトータルな活性として、重症化に関与するのか、防御に働くのかを推定する重要な方法である。今後の抗体調査や患者の診断として有用であると考えられる。

デング 4 価 DNA ワクチンのマウスモデルを用いて解析し、*in vitro* で推定されていたワクチンによる感染増強抗体が実際に *in vivo* で誘導されること、しかし補体の存在下では増強活性が消失することを明らかにした。また、モノクローナル抗体を用いた実験では、移入後の経時的変化から、*in*

vitro での血清希釈と in vivo における抗体濃度減少が、概ね比例することが明らかにされた。

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は、補体の添加により消失することを示したが、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。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り、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。その結果、NEAb以外にEAbやNAbという稀な抗体が発見された。特にEAbは、補体存在下においても増強活性が抑制されず、重症化に関わる抗体であることが示唆された。

DENVのE蛋白分子は、3つのドメインから構成される。本研究では、EAb (D1-V-3H12、D1-IV-3B8) はドメイン I に、またNAb (D1-IV-7F4) はドメイン II 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た。抗体エンジニアリングにより作製された種々のアイソタイプは、異なる抗体活性を示した。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、DENV2やDENV4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、DENV1やDENV3ではIgG1のEAbが比較的多く得られる。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。

中和抗体を誘導するタイプのデングワクチンは、同時に増強抗体を誘導する懸念がある。ワクチン接種により増強抗体が誘導され、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。エピトープ解析は現在世界で精力的に進められており、EAbが対応するエピトープを明らかにすることは、今後開発されるデングワクチンの安全性に寄与するものである。

## E. 結論

中和・増強活性のバランス測定法を開発し、デング4価DNAワクチンはADE抗体を誘導するが、補体が存在すれば消失することを示した。DENV1に対して中和活性あるいは増強活性のみを示すMAbはE蛋白分子の、それぞれドメインIIあるいはドメインIに結合することを示した。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された。

## 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

- 1) Konishi E, Sakai Y, Kitai Y, Yamanaka A: Prevalence of antibodies to Japanese encephalitis virus among

- inhabitants in Java Island, Indonesia, with a small pig population. *Am J Trop Med Hyg.* 2009;80:856-61.
- 2) Yamanaka A, Konishi E: A simple method for evaluating dengue vaccine effectiveness in mice based on levels of viremia caused by intraperitoneal injection of infected culture cells. *Vaccine.* 2009;27:3735-43.
  - 3) Konishi E, Kitai Y: Detection by ELISA of antibodies to Japanese encephalitis virus nonstructural 1 protein induced in subclinically infected humans. *Vaccine.* 2009;27:7053-8.
  - 4) Konishi E: Status of natural infection with Japanese encephalitis virus in Japan: prevalence of antibodies to the nonstructural 1 protein among humans and horses. *Vaccine.* 2009;27:7129-30.
  - 5) Konishi E, Tabuchi Y, Yamanaka A: A simple assay system for infection-enhancing and -neutralizing antibodies to dengue type 2 virus using layers of semi-adherent K562 cells. *J Virol Methods.* 2010;163:360-7.
  - 6) Yamanaka A, Mulyatno KC, Susilowati H, Hendrianto E, Utsumi T, Amin M, Lusida MI, Soegijanto S, Konishi E: Prevalence of Antibodies to Japanese Encephalitis Virus among Pigs in Bali and East Java, Indonesia, 2008. *Japanese Journal of Infectious Diseases* 2010;63:58-60.
  - 7) Konishi E, Kitai Y, Tabei Y, Nishimura K, Harada S: Natural Japanese encephalitis virus infection among humans in west and east Japan shows the need to continue a vaccination program. *Vaccine.* 2010; 28:2664-70
  - 8) Eiji Konishi, Yoko Kitai, Yukiko Tabei, Kouichi Nishimura, Seiya Harada: Natural Japanese encephalitis virus infection among humans in west and east Japan shows the need to continue a vaccination program. *Vaccine.* 28, 2664-2670, 2010
  - 9) Yoko Kitai, Takashi Kondo, Eiji Konishi.: Complement-dependent cytotoxicity assay for differentiating West Nile virus from Japanese encephalitis virus infections in horses. *Clinical and Vaccine Immunology* 17, 875-878, 2010
  - 10) Eiji Konishi, Yoko Kitai, Kouichi Nishimura, Seiya Harada: Antibodies to bovine serum albumin in human sera: problems and solutions with casein-based ELISA in the detection of natural Japanese encephalitis virus infections. *Jpn J Infect Dis.* 63, 296-298, 2010
  - 11) Miwa Kuwahara, Eiji Konishi: Evaluation of extracellular subviral particles of dengue virus type 2 and Japanese encephalitis virus produced by *Spodoptera frugiperda* cells for use as vaccine and diagnostic antigens. *Clin Vaccine Immunol.* 17, 1560-1566, 2010

- 12) Jun-ichi Imoto, Tomohiro Ishikawa, Atsushi Yamanaka, Misako Konishi, Kenji Murakami, Tomoyuki Shibahara, Masanori Kubo, Chang Kweng Lim, Masataka Hamano, Tomohiko Takasaki, Ichiro Kurane, Haruhide Udagawa, Yoshihiro Mukuta, Eiji Konishi: Needle-free jet injection of Japanese encephalitis DNA and inactivated vaccine mixture induces neutralizing antibodies in miniature pigs and protects against fetal death and mummification in pregnant sows. *Vaccine*. 28, 7373-7380, 2010
- 13) Tomohiro Ishikawa and Eiji Konishi: Combating Japanese encephalitis: Vero-cell derived inactivated vaccines and the situation in Japan. *Future Virol.* 5, 785-799, 2010
- 14) Yoko Kitai, Takashi Kondo and Eiji Konishi: Non-structural protein 1 (NS1) antibody-based assays to differentiate West Nile (WN) virus from Japanese encephalitis virus infections in horses: Effects of WN virus NS1 antibodies induced by inactivated WN vaccine. *J Virol Meth.* 171, 123-128, 2011
- 15) Yoko Kitai, Hiroaki Shirafuji, Katsushi Kanehira, Tsugihiko Kamio, Takashi Kondo and Eiji Konishi: Specific Antibody Responses to West Nile Virus Infections in Horses Preimmunized with Inactivated Japanese Encephalitis Vaccine: Evaluation of Blocking ELISA and Complement-Dependent Cytotoxicity Assay. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*. 2011; 11:1093-8

他 12 件

2. 学会発表

44 件

H. 知的財産権の出願・登録状況  
なし