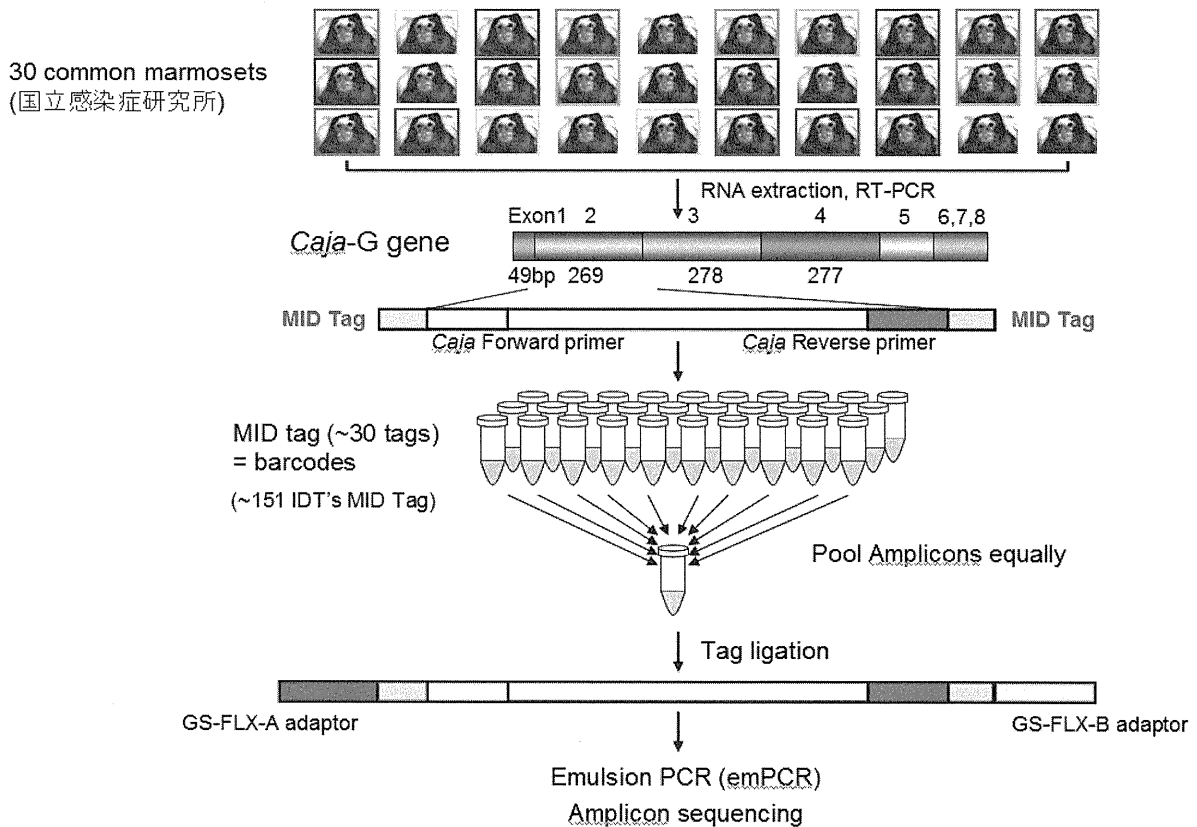


Pyrosequencing with Roche Genome Sequencer FLX System



MHC genotyping using massively parallel pyrosequencing

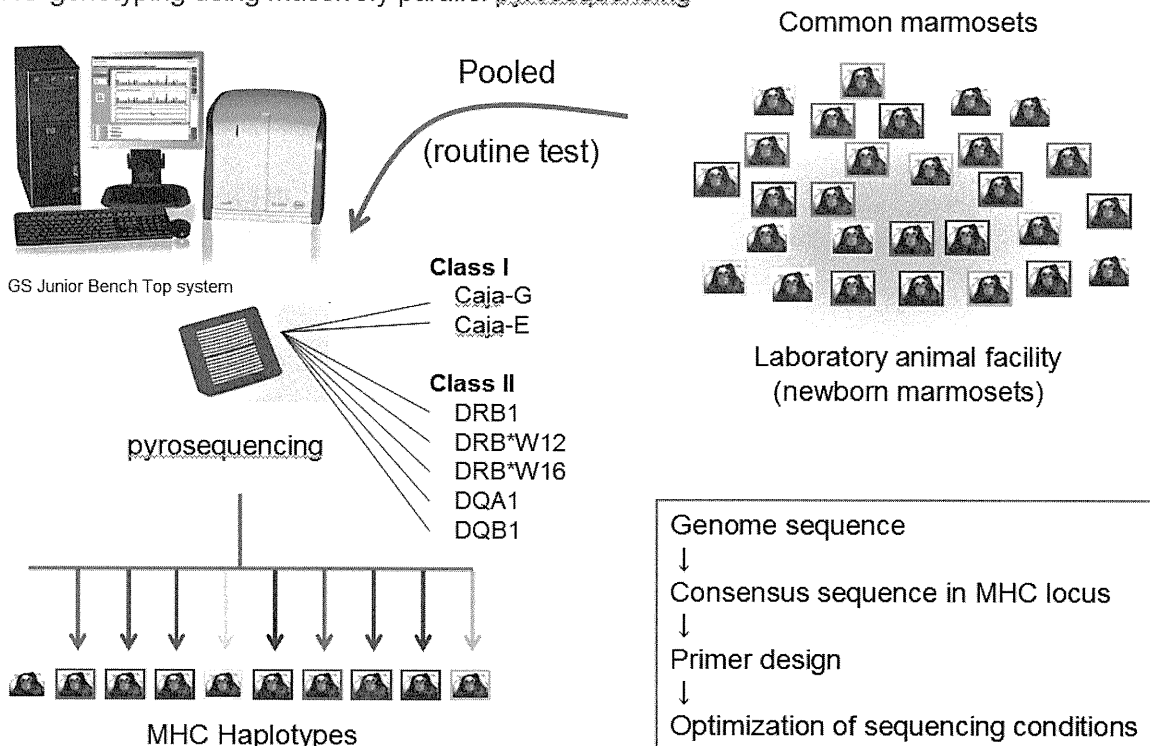


図 4. 次世代シーケンサーを用いた *Caja-G* 遺伝子ハプロタイプの決定

Accession Number	gene name	FR 1 (1-26)			CDR 1 (27-38)		FR 2 (39-55)		CDR 2 (56-65)		FR 3 (66-104)			CDR 3 (105-)	Nucleotide identity	Amino acid identity
		1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100				
AB504390	CJTRAV1-2	GQNI	GG	PTEVT	A	M	A	G	A	G	A	G	A	A	90.9	83.5
AB504391	CJTRAV2	RQVSD	P	STV	A	S	V	A	S	S	A	S	V	A	95.7	92.9
AB504392	CJTRAV4	LAKT	T	P	S	M	S	Y	E	G	A	V	I	C	91.6	87.9
AB504393	CJTRAV5	GQDK	M	K	S	L	F	L	S	V	R	E	G	A	89.1	80.4
AB504394	CJTRAV8-1	AQSV	O	P	D	H	I	V	S	E	G	A	S	L	91.9	85.1
AB504395	CJTRAV8-3	AQSV	O	P	D	H	I	V	S	E	G	A	S	L	96.4	97.8
AB504396	CJTRAV8-6s1	AQSV	O	P	D	H	I	V	S	E	G	A	S	L	90.0	78.5
AB504397	CJTRAV8-6s2	AQSV	O	P	D	H	I	V	S	E	G	A	S	L	88.0	78.7
AB504398	CJTRAV9-1	GNSV	O	T	E	G	V	E	L	S	E	G	A	S	91.8	83.9
AB504400	CJTRAV12-1	QKEV	E	O	P	D	H	I	V	S	E	G	A	S	93.7	88.9
AB504401	CJTRAV12-2	QKLE	E	O	P	D	H	I	V	S	E	G	A	S	94.1	91.1
AB504402	CJTRAV12-3	QKEV	E	O	P	D	H	I	V	S	E	G	A	S	90.9	86.8
AB504403	CJTRAV13-1	GENE	O	P	D	H	I	V	S	E	G	A	S	92.8	87.0	
AB504404	CJTRAV16	AGRV	T	O	P	E	K	L	S	A	S	V	A	A	90.4	82.8
AB504405	CJTRAV17	SQGE	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	91.4	86.5
AB504406	CJTRAV18	ADQV	T	O	P	E	K	L	S	A	S	V	A	A	91.2	81.4
AB504407	CJTRAV19	AQV	I	O	A	G	T	E	I	V	S	E	G	A	94.6	92.3
AB504408	CJTRAV20	ADQV	T	O	P	E	K	L	S	A	S	V	A	A	91.7	83.3
AB504409	CJTRAV21	KQEV	T	O	P	E	K	L	S	A	S	V	A	A	92.5	85.4
AB504410	CJTRAV22	G1QV	E	O	P	D	H	I	V	S	E	G	A	S	94.6	94.8
AB504411	CJTRAV23	QQV	E	O	P	D	H	I	V	S	E	G	A	S	93.7	87.4
AB504412	CJTRAV24	TQLE	E	O	P	D	H	I	V	S	E	G	A	S	91.0	79.3
AB504423	CJTRAV25	GQI	I	O	P	H	O	V	E	D	E	F	I	C	95.7	93.4
AB504413	CJTRAV26-1	DAK	T	O	P	S	M	O	C	A	E	G	R	A	92.7	89.0
AB504414	CJTRAV26-2	DAK	T	O	P	S	M	O	C	A	E	G	R	A	94.9	92.4
AB504415	CJTRAV27	TQLE	E	O	P	D	H	I	V	S	E	G	A	S	94.1	93.3
AB504416	CJTRAV29	DQV	K	O	N	T	P	F	L	S	V	O	G	E	93.0	85.6
AB504417	CJTRAV30	SQLE	E	O	P	D	H	I	V	S	E	G	A	S	91.4	80.4
AB504418	CJTRAV36	EDK	I	O	P	S	P	L	S	V	H	E	D	E	93.8	92.3
AB504419	CJTRAV37	QLP	V	E	O	P	D	H	I	V	S	E	G	A	90.5	81.3
AB504420	CJTRAV38-1	AQV	T	O	P	S	E	S	E	M	S	V	A	A	95.6	90.2
AB504421	CJTRAV38-2	SQV	A	O	P	D	H	I	V	S	E	G	A	S	95.1	91.7
AB504422	CJTRAV39	ELK	V	G	O	P	D	H	I	V	S	E	G	A	93.4	86.5
AB504424	CJTRAV41	KNEV	O	P	D	H	I	V	S	E	G	A	S	92.0	82.6	
														92.3	83.9	
Average															92.6	86.8

Accession Number	gene name	FR 1 (1-26)			CDR 1 (27-38)		FR 2 (39-55)		CDR 2 (56-65)		FR 3 (66-104)			CDR 3 (105-)	Nucleotide identity	Amino acid identity
		1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100				
AB504471	CJTRBV2 (*)	EPEV	T	G	P	S	H	V	T	M	G	O	E	V	92.3	86.2
AB504472	CJTRBV3-2 (*)	DSAV	S	O	T	P	K	L	V	T	O	M	K	E	93.5	89.2
AB504473	CJTRBV4-1s1 (*)	DTG	V	T	O	T	P	K	H	L	V	M	G	N	91.6	85.3
AB504474	CJTRBV4-1s2 (*)	DTG	V	T	O	T	P	K	H	L	V	M	G	N	91.3	83.2
AB504475	CJTRBV4-1s3	DTG	V	T	O	T	P	K	H	L	V	M	G	N	92.0	82.1
AB504476	CJTRBV4-2	DTG	V	T	O	T	P	K	H	L	V	M	G	N	90.8	86.3
AB504477	CJTRBV5-1s1	EAG	V	T	O	T	P	R	H	L	I	K	M	R	95.5	80.0
AB504478	CJTRBV5-1s2 (*)	EAEV	T	O	T	P	R	H	L	I	K	M	R	G	90.8	77.9
AB504479	CJTRBV5-3	QAK	V	T	O	T	P	R	H	L	I	K	M	R	99.4	83.0
AB504480	CJTRBV6-5s1 (*)	NAG	V	T	O	T	P	K	H	L	V	M	G	N	90.6	80.0
AB504481	CJTRBV6-5s2	TAG	V	T	O	T	P	K	H	L	V	M	G	N	91.9	85.1
AB504482	CJTRBV7-2s1	GAG	V	T	O	T	P	K	H	L	V	M	G	N	91.7	86.5
AB504483	CJTRBV7-2s2	DAG	V	T	O	T	P	K	H	L	V	M	G	N	89.6	83.3
AB504484	CJTRBV7-6 (*)	EAG	V	T	O	T	P	K	H	L	V	M	G	N	91.2	81.1
AB504485	CJTRBV7-9	GAG	V	T	O	T	P	K	H	L	V	M	G	N	90.9	78.9
AB504486	CJTRBV9	DSG	V	T	O	T	P	K	H	L	V	M	G	N	92.2	86.2
AB504487	CJTRBV10-1	DAE	I	O	S	P	R	H	L	I	T	E	G	R	90.9	83.2
AB504488	CJTRBV10-2	DAE	I	O	S	P	R	H	L	I	T	E	G	R	89.7	81.7
AB504489	CJTRBV11-1 (*)	EAG	V	T	O	T	P	K	H	L	V	M	G	N	92.7	87.4
AB504490	CJTRBV11-2	ETG	V	T	O	T	P	K	H	L	V	M	G	N	93.0	86.3
AB504491	CJTRBV12-3 (*)	DAE	V	I	O	S	P	H	L	I	T	E	G	R	92.4	87.5
AB504492	CJTRBV12-5	DAR	V	T	O	T	P	K	H	L	V	M	G	N	92.4	87.5
AB504493	CJTRBV13	AAG	V	T	O	T	P	K	H	L	V	M	G	N	94.0	88.3
AB504494	CJTRBV14 (*)	AAG	V	T	O	T	P	K	H	L	V	M	G	N	90.2	78.9
AB504495	CJTRBV15 (*)	DAM	V	I	O	S	P	H	L	I	T	E	G	R	90.9	82.1
AB504496	CJTRBV18	NAG	V	T	O	T	P	K	H	L	V	M	G	N	90.5	86.3
AB504497	CJTRBV19	DGI	I	O	S	P	K	H	L	V	M	G	N	95.2	91.5	
AB504498	CJTRBV20-1 (*)	GAV	S	O	P	D	H	I	V	S	E	G	A	90.0	79.4	
AB504499	CJTRBV21-1 (*)	DTK	V	O	T	P	K	H	L	V	M	G	N	90.7	80.6	
AB504500	CJTRBV23-1 (*)	HAK	V	T	O	T	P	K	H	L	V	M	G	N	92.4	83.3
AB504501	CJTRBV24-1 (*)	DAG	V	T	O	T	P	K	H	L	V	M	G	N	91.5	80.9
AB504503	CJTRBV27	EAG	V	T	O	T	P	K	H	L	V	M	G	N	92.6	88.3
AB504504	CJTRBV28 (*)	EKV	T	O	T	P	K	H	L	V	M	G	N	91.2	81.9	
AB504505	CJTRBV29-1	GAV	S	O	P	D	H	I	V	S	E	G	A	90.9	81.3	
AB504506	CJTRBV30	SOT	I	H	O	V	A	T	L	O	P	D	H	I	93.6	90.4
Average															91.3	84.0

*: Genes reported in the previous study

図 5. コモンマウスにおける TRAV および TRBV 遺伝子の一覧

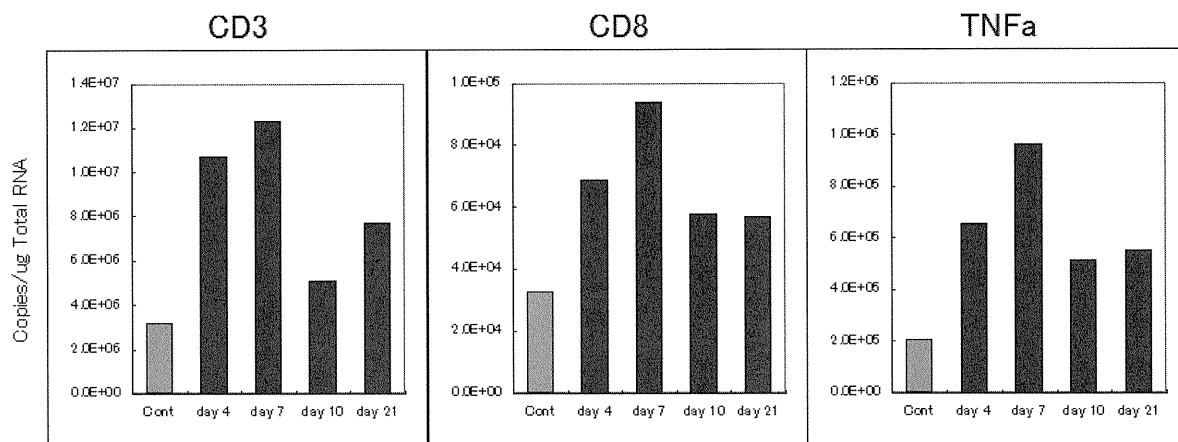


図 6. CHIKV 感染コモンマーマウス脾臓におけるリアルタイム PCR 解析結果 (Cont はコントロール、day は感染日数を示す)

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

研究要旨：本研究では WNV 感染モデルマウスを作成し、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、脳内浸潤 T 細胞の免疫学的性状解析を実施した。昨年度までに得られた研究成果より、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 細胞はクローンレベルで異なり、さらに IFN- γ 産生能を指標とした交差反応試験において、近縁ウイルス間で交差性を認めなかったことを証明した。本年度は、これら WNV 特異的 T 細胞において、免疫学的性状を詳細に評価するため、脳内浸潤 T 細胞を CD4 および CD8 に分離し、各ウイルス感染腹腔細胞との共培養系を用いて IFN- γ および TNF- α 産生能を検討した。その結果、WNV 脳内浸潤 CD8+T 細胞と WNV 感染腹腔細胞の共培養においてのみ、IFN- γ および TNF- α の産生誘導が確認された。したがって WNV 初回感染時の感染初期の局所では、感染細胞を排除するために細胞傷害性 T 細胞が展開することがタンパク質レベルにおいて示唆された。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

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、発熱のみならず、致死的な脳炎などの疾病を起こすことがある。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で、本邦には存在しない WNV のような海外疾病が侵入する可能性は十分に考えられる。発症メカニズムやワクチン開発においても、本邦に存在する疾病と比較して情報は不足しており、病態解明などの基礎的研究は急務である。

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 遺伝子を持ち、抗原特異的 T 細胞であることを解明した。

さらに、WNV 脳内浸潤 T 細胞と WNV 感染腹腔細胞の共培養系で IFN- γ 産生誘導を認めしたが、JEV 感染腹腔細胞との共培養では有意な産生を認めなかったため、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。

しかしながら、WNV 特異的脳内浸潤 T 細胞の詳細な分類および炎症性サイトカインの産生について、タンパクレベルでの検討が完了していない。したがって本年度は、脳内浸潤 T 細胞を CD4 および CD8 に分離し、各ウイルス感染腹腔細胞との共培養系を用いて IFN- γ および TNF- α 産生能を検討した。

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^k) マウスに感染させた。

(2) 細胞分離：WNV および JEV 感染マウス脳内浸潤 T 細胞を磁気細胞分離法（MACS）で CD4+T 細胞および CD8+T 細胞に分離した。

(3) 感染腹腔細胞の作成：*in vitro* における WNV および JEV に対する交差性を評価する

ために、C3H/HeNJcl (H-2k)、C57BL/6JJcl (H-2b)、BALB/cAJcl (H-2d)マウスより腹腔細胞を採取し、WNVおよびJEVを感作させた。

(4) 炎症性サイトカインの測定：WNV および JE V 感染マウス脳浸潤 T 細胞と各感染腹腔細胞を共培養し、IFN- γ および TNF- α 産生能を解析した。

(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 感染 C3H/HeNJcl (H-2k) マウス脳内浸潤 T 細胞と WNV 感染腹腔細胞の共培養系において、IFN- γ および TNF- α の産生誘導を確認した。しかし、ウイルス間およびマウス間の交差性は認められなかった (表-1)。

(2) WNV 脳内浸潤 CD8+T 細胞と WNV 感染腹腔細胞の共培養系において、IFN- γ および TNF- α の産生誘導を確認した。しかし、JEV 感染腹腔細胞との共培養、WNV 脳内浸潤 CD4+T 細胞では有意な産生は認められなかった (表-2)。

D. 考察

前年度の実験において認められた *in vitro* における T 細胞による IFN- γ 誘導能の傾向と関連し、TNF- α においても WNV および JE V 間での交差反応性は認められなかった。さらに IFN- γ および TNF- α 誘導能を示す WNV 特異的 T 細胞が、CD8+T 細胞に限られたことは、WNV 初回感染時の感染初期の局所では、感染細胞を排除するために細胞傷害性 T 細胞が展開することが示唆された。

本研究結果は、前年度までの解析で完了した mRNA ベースのリアルタイム PCR の結果と関連しており、したがって WNV 感染時 T 細胞存在下でのマウス脳内の免疫応答が Th1/Tc1 タイプであったことを、タンパク質レ

ベルで裏付けたものと考えられる。

E. 結論

本研究により、WNV 初回感染時に誘導される CD8+T 細胞がウイルス特異的に活性化されたことをタンパク質レベルで証明した。これは T 細胞によって認識されるウイルス抗原部位がウイルス間で全く異なることを示すため、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必要があることを示唆した。

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, Fujii Y, Hayasaka D, Matsutani T, Shirai K, Nagata N, Lim CK, Suzuki S, Takasaki T, Suzuki R, Kurane I. : High clonality of virus-specific T lymphocytes defined by TCR usage in the brains of mice infected with West Nile virus.

J Immunol. 2011 Oct 15;187(8):3919-30.

2. 学会発表

北浦一孝、松谷隆治、藤井克樹、白井颯治、鈴木さつき、高崎智彦、小笠原康悦、西本憲弘、倉根一郎、鈴木隆二：新世界ザルにおける T 細胞受容体 β 鎖遺伝子の CDR3 領域における正の選択。第 40 回日本免疫学会学術集会 (東京) 2011 年 11 月 27-29 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 感染腹腔細胞と共培養した後の IFN- γ および TNF- α 産生量

PEC isolated from	Virus infection	IFN- γ production (pg/mL)		TNF- α production (pg/mL)	
		T-cells isolated from WNV-infected C3H/HeN mice brain	T-cells isolated from JEV-infected C3H/HeN mice brain	T-cells isolated from WNV-infected C3H/HeN mice brain	T-cells isolated from JEV-infected C3H/HeN mice brain
C3H/HeNjcl (H-2 ^k)	WNV	1446.6 \pm 55.5	20.3 \pm 8.5	476.9 \pm 46.7	26.4 \pm 9.8
	JEV	18.7 \pm 3.1	1038.2 \pm 53.4	19.8 \pm 7.2	370.1 \pm 84.1
	none	18.3 \pm 4.5	17.5 \pm 6.5	22.7 \pm 3.1	25.2 \pm 4.9
C57BL/6Jjcl (H-2 ^b)	WNV	24.1 \pm 7.2	22.1 \pm 4.4	21.9 \pm 6.1	25.3 \pm 7.4
	JEV	26.3 \pm 8.6	24.7 \pm 3.9	19.2 \pm 4.3	24.2 \pm 5.4
	none	25.0 \pm 6.5	20.1 \pm 4.2	23.3 \pm 5.9	26.2 \pm 6.2
BALB/cAJcl (H-2 ^d)	WNV	15.7 \pm 2.5	21.1 \pm 7.1	27.2 \pm 8.4	24.1 \pm 4.7
	JEV	18.9 \pm 3.6	23.7 \pm 5.8	26.3 \pm 6.0	24.4 \pm 1.2
	none	23.3 \pm 7.5	24.7 \pm 2.2	27.0 \pm 9.1	29.6 \pm 3.3

Levels of IFN- γ and TNF- α were assessed by ELISA in the supernatants of T cells isolated from WNV or JEV-infected mouse brains (n=8) after *in vitro* stimulation for 12 hours with PEC infected with WNV or JEV. Numbers indicate the mean \pm SD of IFN- γ and TNF- α production (pg/mL) in triplicate wells.

表-2. WNV 感染マウス脳分離 CD4+ および CD8+ T 細胞を WNV および JEV 感染腹腔細胞と共培養した後の IFN- γ および TNF- α 産生量

C3H/HeN PEC infected with	Isolated cells from WNV-infected C3H/HeN mice brain			
	IFN- γ production (pg/mL)		TNF- α production (pg/mL)	
	CD4+ cells	CD8+ cells	CD4+ cells	CD8+ cells
WNV	15.4 \pm 4.2	1358.1 \pm 74.5	26.4 \pm 3.9	623.6 \pm 49.2
JEV	17.1 \pm 4.7	19.8 \pm 8.2	23.9 \pm 5.8	23.1 \pm 6.1
none	16.6 \pm 6.1	24.7 \pm 6.9	24.1 \pm 7.7	28.5 \pm 2.7

Levels of IFN- γ and TNF- α were assessed by ELISA in supernatants of CD4+ or CD8+ cells isolated from WNV-infected mouse brains (n=8) after *in vitro* stimulation for 12 hours with PEC infected with WNV or JEV. Numbers indicate the mean \pm SD of IFN- γ and TNF- α production (pg/mL) in 3 wells.

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)

「我が国への侵入が危惧される蚊媒介性ウイルス感染症に対する

総合的対策の確立に関する研究」(H23-新興-一般-010)

分担研究報告書

ヒトスジシマカのデングウイルス感受性の検討

—評価系の確立—

分担研究者 沢辺京子 (国立感染症研究所 昆虫医科学室長)

研究協力者 佐々木年則・伊澤晴彦・楯田龍星 (国立感染症研究所 昆虫医科学部)

田島 茂・高崎智彦 (国立感染症研究所 ウイルス第一部)

研究要旨

我が国への侵入が危惧される蚊媒介性ウイルス感染症に対する総合的防除法の確立を目的とし、本研究では、南アジア全域で重大な健康被害をもたらしているデングウイルス(DENV)の国内産ヒトスジシマカにおける感受性を評価しようと考えた。まず、TaqMan プローブ法および免疫蛍光抗体法によるDENV 評価系の確立を試みた。

実験室内で血清型 1-4 の各 DENV(以下、それぞれ DENV1, DENV2, DENV3 および DENV4 とする)のゲノム RNA を TaqMan プローブ法により定量した。DENV1, DENV2, DENV3 はそれぞれ検出されたが、DENV4 は検出できなかった。次いで、免疫蛍光抗体法を用いて DENV 感染蚊の器官におけるウイルス粒子の検出を試みた。その結果、DENV2 を感染させたヒトスジシマカの唾液腺および中腸では、ウイルス粒子の存在が確認されたが、DENV1 はいずれの器官からも検出されなかった。本結果から、TaqMan プローブ法および免疫蛍光抗体法により、DENV の感受性の評価が可能であることが示唆された。

実験に用いた国内産(神奈川県海老名市捕集)ヒトスジシマカは、DENV2 に感受性が高く、DENV1 に感受性が低かったが、他の地域で捕集される本種蚊のすべてに当てはまるのか、蚊・ウイルス株の両者ともに様々な組み合わせによる結果から、国内産蚊のウイルス感受性を評価する必要がある。

A. 研究目的

デングウイルス(DENV; 以下、各血清型を DENV1, DENV2, DENV3 および DENV4 とする)は、フラビウイルス科に属する RNA ウイルスである。世界的には年間数千万人から 1 億人がデング熱に感染し、そ

のうちの数十万人がデング出血熱を発症している。地球温暖化や流行地の都市化現象による、媒介蚊の生息域と発生数の増加等が要因となり、流行域拡大が最も危惧される蚊媒介性感染症である。アジアにおいては、日本、韓国、中国北部を除くほとんどすべて

の国で、デング熱の流行が報告されている。

我が国においては、東南アジアから帰国した船員によって1942年の夏に病気が持ち込まれ、国内に生息するヒトスジシマカが媒介蚊となり、その後3年間にわたり流行したことがよく知られている。当時の総患者数は1万7千人に達したと報告された。その後、国内感染例は報告されていないが、海外旅行者数の増加に伴い、輸入症例は年々増加し、2010年には220症例を超えて感染症法施行後最高の症例数となった。輸入症例の中で毎年2・3例のデング出血熱が報告されている。このように、我が国においても、デング熱を国際感染症として重要性の高い感染症の一つと認識し、DENVの国内侵入を警戒しなければならない。

日本国内には、DENV媒介蚊となり得るヒトスジシマカは普遍的に分布しているが、さらに近年、青森県南部への侵入と定着がほぼ確実となり、九州・沖縄から本州全域にまで広くその分布域が拡大しつつある。そこで本研究では、国内産ヒトスジシマカのDENV感受性を検討するために、まず、評価系の確立を試みた。

B. 研究方法

ヒトスジシマカは、2011年9月に神奈川県海老名市で成虫を捕集し、その後実験室内で維持した子孫をDENVの感染実験に用いた。使用したDENVは、ウイルス第一部から分与を受けたDENV1、DENV2、DENV3、およびDENV4である(詳細は省略)。

脱繊維血と混合した 10^6 コピー/mlの各ウイルス液を、人工膜吸血法を用いて雌蚊に経口的に接種させた。感染蚊はその後一定期間27°C長日下に維持した。

DENVの検出は、TaqManプローブ法(Callahan *et al.*, 2001)および免疫蛍光抗体法により行った。

C. 研究結果

1. TaqManプローブ法による検出

DENV1およびDENV3のウイルス液を希釈し、TaqManプローブ法によりウイルスRNAを検出した。その結果、DENV1およびDENV3はそれぞれ1コピーまで検出することが確認された(図1)。次に、DENV2およびDENV4についても同様にTaqManプローブ法によりウイルスRNAの検出を試みた。その結果、DENV2は検出されたが、DENV4は検出できなかった(図2)。

2. 免疫蛍光抗体法による検出

DENV2を経口感染させた、感染24日目のヒトスジシマカ雌から、唾液腺および中腸を摘出した。DENV2特異的抗体を反応させた免疫蛍光抗体法により、唾液腺、中腸のいずれにおいてウイルス粒子の存在が確認された(図3)。一方、DENV1を経口感染させたヒトスジシマカの感染21日目の唾液腺には、ウイルス粒子は確認できなかった(データは省略)。

D. 考察

国内産ヒトスジシマカにおけるDENV感受性を検討するために、TaqManプローブ法および免疫蛍光抗体法による評価系の確立を試みた。

TaqManプローブ法によるウイルスRNAの検出において、DENV1、DENV2、DENV3の定量は可能であったが、DENV4は定量できなかった。この結果は、DENV4のスタン

ダード RNA に問題があったことが考えられたため、新たに作製し再検討したいと考えている。また、DENV1, DENV2, DENV3 の検出結果から、DENV のゲノム RNA は、本 TaqMan プローブ法 (Callahan *et al.*, 2001) により 0.1 コピーまでは検出可能であると推測された。

免疫蛍光抗体法を用いて DENV1 および DENV2 の検出を試みた結果、DENV2 はヒトスジシマカの唾液腺と中腸のいずれにもウイルス粒子は観察されたが、DENV1 はどちらの器官においても検出されなかった。蚊のウイルス感受性の評価系として本免疫蛍光抗体法も有効であることが示唆された。しかし、本研究では、海老名市捕集のヒトスジシマカを用いて感染蚊を作製した結果、DENV1 と DENV2 の増殖に差異が認められたが、本結果が、すべての国内産ヒトスジシマカに適合するかは不明である。また、使用したウイルス株も異なる国の患者血清由来であることから、今後は、蚊・ウイルス株の両者ともに様々な組み合わせでウイルス感受性を評価する必要があると考える。

E. 結論

- 1) DENV1, DENV2, DENV3 のウイルス RNA の定量・評価系を確立できた。
- 2) DENV4 は定量できなかったことから、スタンダード RNA の作製を検討する必要がある。
- 3) 免疫蛍光抗体法を用いて DENV2 感染蚊の唾液腺および中腸でのウイルスの存在が確認された。

4) 免疫蛍光抗体法によって DENV1 は検出できなかったが、その他の国内産ヒトスジシマカにも適合する結果なのか、異なる系統とウイルス株を用いて再度確認する。

F. 健康危険情報

なし

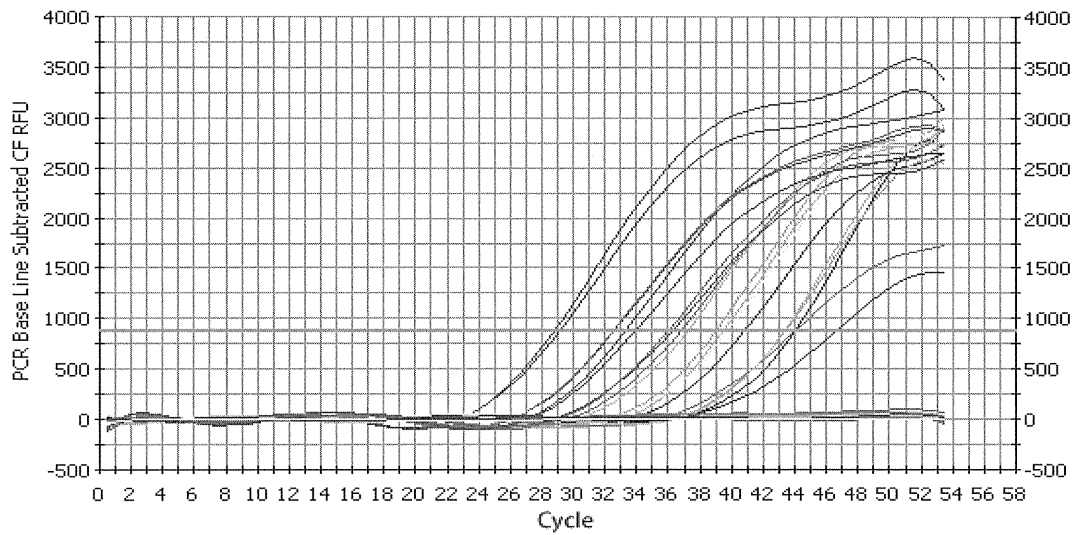
G. 研究発表

1. 論文発表：なし
2. 学会発表：なし

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得：なし
2. 実用新案登録：なし
3. その他：なし

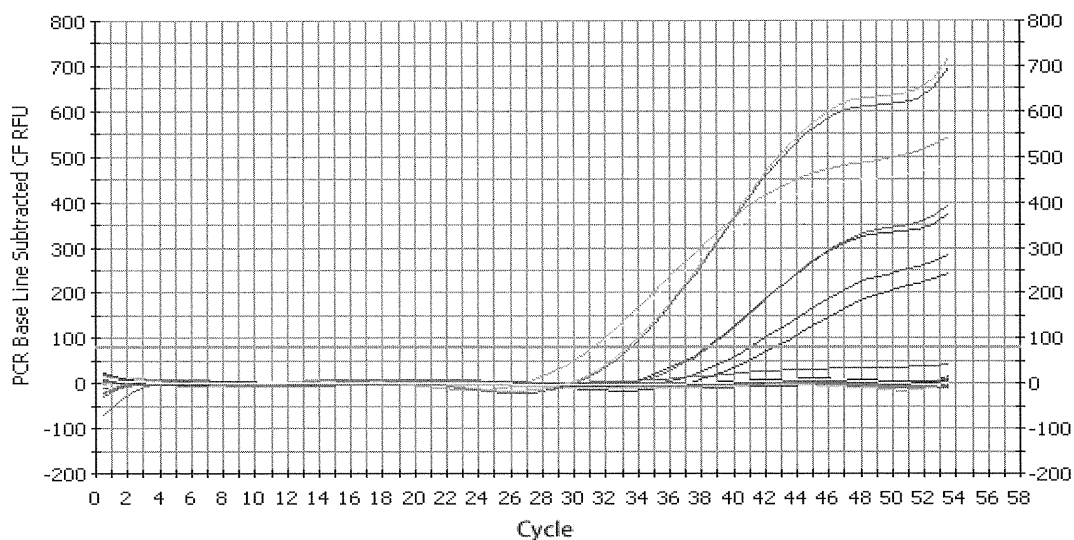
DENV1, DENV3 (FAM)



Sample	Ct
None	ND
Type I 1:1 dilution of cDNA	28.9±0.1
Type I 1:10 dilution of cDNA	32.5±0.0
Type I 1:100 dilution of cDNA	36.1±0.2
Type I 1:1,000 dilution of cDNA	39.3±0.3
Type I 1:10,000 dilution of cDNA	43.9±0.0
Type III 1:1 dilution of cDNA	33.5±0.3
Type III 1:10 dilution of cDNA	37.0±0.3
Type III 1:100 dilution of cDNA	40.3±0.5
Type III 1:1,000 dilution of cDNA	43.3±0.0
Type III 1:10,000 dilution of cDNA	46.5±0.0

図 1. TaqMan プローブ法による DENV1 および DENV3 ウイルス RNA の検出

DENV2, DENV4 (VIC)



Sample	Ct
None	ND
Type II 1:1 dilution of cDNA	31.2 ± 0.2
Type II 1:10 dilution of cDNA	33.4 ± 0.1
Type II 1:100 dilution of cDNA	38.3 ± 0.1
Type II 1:1,000 dilution of cDNA	41.8 ± 0.8
Type II 1:10,000 dilution of cDNA	ND
Type IV 1:1 dilution of cDNA	ND
Type IV 1:10 dilution of cDNA	ND
Type IV 1:100 dilution of cDNA	ND
Type IV 1:1,000 dilution of cDNA	ND
Type IV 1:10,000 dilution of cDNA	ND

図 2. TaqMan プローブ法による DENV2 および DENV4 ウイルス RNA の検出

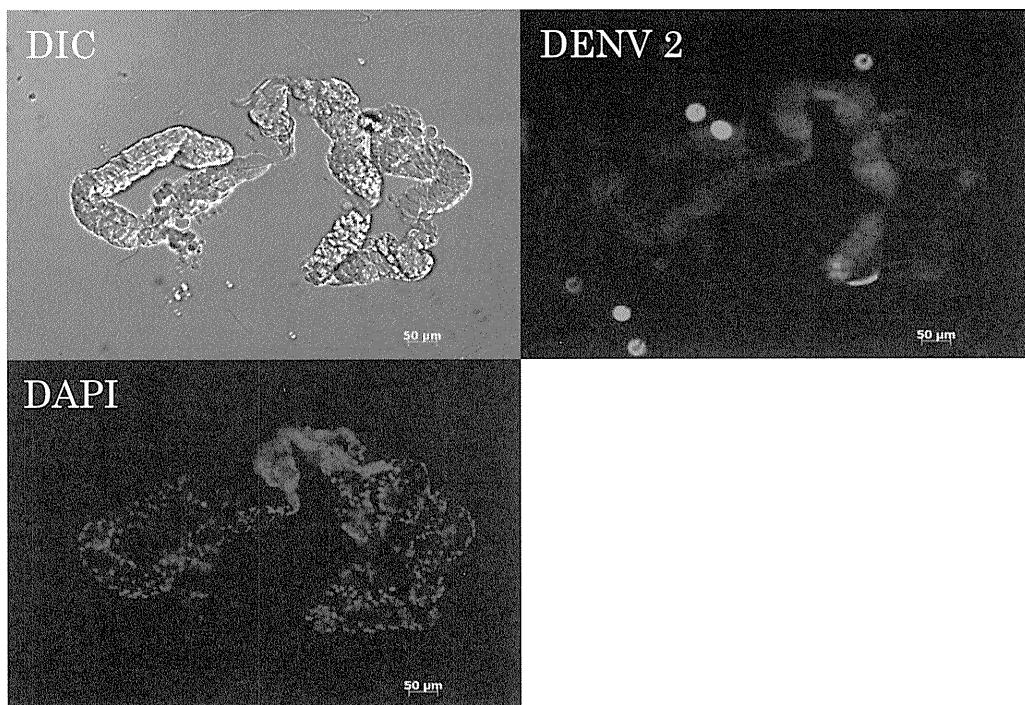


図 3. ヒトスジシマカ唾液腺における DENV2 の免疫蛍光抗体法による検出

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）
「我が国への侵入が危惧される蚊媒介性ウイルス感染症に対する
総合的対策の確立に関する研究」

分担研究報告書

チクングニア熱を予防する DNA ワクチンの試作

分担研究者 小西英二（大阪大学微生物病研究所教授）

研究要旨 チクングニアウイルスは、アフリカ、アジアの広範囲に分布する、蚊媒介性のアルファウイルスである。ヒトに感染すると、発疹性熱性疾患であるチクングニア熱を引き起こす。通常は非致死性であるが、関節痛が長く残る場合があり、患者の日常生活に影響を与えている。近年、輸入感染症例から流行へ至った例も報告されている。媒介蚊となるヒトスジシマカは日本を含め広範囲に生息しているため、世界各国で侵入が警戒されている。予防策としてワクチンの開発が試みられているが、現在認可されているワクチンはない。本研究では、ウイルスゲノムのうち構造蛋白の一部をコードする遺伝子を発現する、DNAワクチンの作製を行った。培養細胞に導入した結果、細胞内でウイルス抗原が発現されていることは確認できたが、細胞外への抗原放出は認められなかった。シグナル配列を付加するなどの改良が必要であるが、DNAワクチンは製造が簡便かつ安価であることから、需要を満たす戦略と考えられる。

A. 研究目的

チクングニアウイルス（CHIKV）は主にアフリカ、南アジア、東南アジアに分布するトガウイルス科のアルファウイルスである。ヒト-蚊-ヒトの感染環を形成し、ヒトに感染するとチクングニア熱（CHIKF）を引き起こす。CHIKFは通常は非致死性の発疹性熱性疾患であるが、必発する関節痛は数週間から数カ月にわたって続く場合があり、重症例では神経症状や劇症肝炎による死亡も報告されている。

急性期のヒトにおけるウイルス血症が非常に高いため、吸血した蚊がCHIKVに感染する可能性は極めて高く、急速に伝播すると思われる。2005 - 2006 年の西インド洋諸国での流行ではレユニオン島の人口の 3 分の 1 以上が感染し、2007 年にはイタリアで輸入感染症患者による流行が報告されている。媒介蚊として第一に挙げられるのはネッタイシマカであり、これらの流行での主要媒介蚊はヒトスジシマカであった。ヒ

トスジシマカは、わが国でも東北以南に生息している。2006 年以降、CHIKV 流行地域への旅行者から日本へ持ち込まれた輸入症例が年間数例報告されており、わが国での流行の可能性は否定できない。チクングニア熱は、2011 年 2 月に感染症法の 4 類感染症に追加された。

現在、CHIKF に対する特異的な治療方法はなく、認可された予防ワクチンもない。したがって、現状では媒介蚊対策が唯一の予防策である。ワクチン開発の試みは、古く 1960 年代になされている。弱毒ワクチンの手法で第 2 相臨床試験まで進められたが、副反応のため開発が中止された。しばらくの間ワクチン開発は行われなかったが、上記の西インド洋諸国での流行に端を発する複数の大陸における流行を契機として、再びワクチン開発研究が行われるようになった。

CHIKV 感染後は症状の有無にかかわらず終生免疫が獲得されると言われており、

その主体は液性免疫（中和抗体）と考えられている。したがって中和抗体の誘導を指標として、ワクチンが評価されてきた。また、マウスやサルなど動物モデルを用いた防御試験もワクチン評価に用いられてきた。近年、キメラウイルスワクチン、弱毒ワクチンなど、種々の戦略のワクチンが開発中である。すでにCHIKVが土着している地域、今後侵入が危惧されている地域は広範囲に及ぶため、製造が簡便かつ安価なワクチン開発が望まれる。

CHIKVのウイルス粒子形成には構造蛋白であるE1、E2、E3、6Kが関わることが知られており、これらの遺伝子を導入した細胞からは、空のウイルス様粒子が放出されることが報告されている。当教室ではこれまでに、デングウイルス、日本脳炎ウイルスを用いた研究により、粒子形成に関わる遺伝子領域を組込んだDNAワクチンが効果的に中和抗体を誘導することを動物モデルで証明してきた。DNAワクチンは大量製造が可能であり、安価なワクチン開発の手法として注目されている。

本研究では、CHIKVのE1 - E3、6K遺伝子を組込んだDNAワクチンを試作し、基礎的な評価を行った。具体的には、CHIKVゲノムから目的遺伝子を増幅し、ベクタープラスミドに組込んだDNAワクチンを作製し、培養細胞に導入して蛋白の発現を確認した。

B. 研究方法

細胞：チャイニーズハムスター由来のCHO細胞を、10%FBS添加イーグルMEM培地を用いて37°Cで培養した。

ウイルスゲノム：CHIKVのBaH306株（AY424803）、SL10571株（AB455494）、S27株（AF369024）を用いた。これらのウイルスゲノムRNAは国立感染症研究所ウイルス第一部の高崎智彦室長から分与を受けた。

プラスミド：BaH306株、SL10571株、S27株のウイルスゲノムRNAから、各プライマー（表1）を用いたRT-PCRを行い、E1 - E3、6K遺伝子をpcDNA3ベクターに組込んだ（図1）。これらのプラスミドはそれぞれpcCHIK-306、pcCHIK-SL、pcCHIK-27とした。CHO細胞への遺伝子

導入試薬として、LipofectamineLTX（Invitrogen社）を用いた。

免疫染色：100%エタノールで固定した細胞を、CHIKVに対するウサギポリクローナル血清で反応後、ABC染色した。

培養上清中の抗原検出サンドイッチELISA：CHIKVに対するウサギポリクローナル血清を感作したマイクロプレートに、抗原検体、CHIKVに対するマウスポリクローナル血清、アルカリフォスファターゼ標識抗マウスIgG、パラニトロフェニルリン酸を順に反応させた。

ウエスタンブロット：限外濾過法により濃縮したCHIKV遺伝子導入細胞の培養上清をSDS-ポリアクリルアミド電気泳動の後、ポリビニリデンジフルオライド膜に転写した。転写された蛋白をCHIKVに対するウサギポリクローナル血清で染色した。

C. 研究結果

CHIKV抗原の細胞内発現：pcCHIK-306、pcCHIK-SL、pcCHIK-27をLipofectamineLTXを用いてCHO細胞へ導入し、導入24時間後に細胞を固定した。免疫染色により、全てのプラスミドにおいて細胞内でのCHIKV抗原の発現が確認された（図2）。

CHIKV抗原の細胞外への放出：CHIKV遺伝子をCHO細胞に導入し、導入24時間後および48時間後に培養上清を回収した。培養上清中のCHIKV抗原は、全てのプラスミドにおいてELISAでの検出レベル以下であったため、限外濾過法によりおよそ100倍に濃縮した。しかし、濃縮後に行ったELISAおよびウエスタンブロットにおいてもCHIKV抗原を検出することはできなかった。（データ示さず）。

D. 考察

粒子形成には、E1-E3および6K蛋白をコードする遺伝子が必要とされる。これまでのワクチン開発研究において、これらの遺伝子群の全長または一部の遺伝子、さらにその組み合わせが用いられてきた。この中で、E2が中和抗体を誘導する主要なエpitepを含むと考えられている。

本研究では、E1-E3および6K蛋白をコードする遺伝子を細胞に導入し、細胞内で

CHIKV抗原の発現を確認した。したがって、細胞内では蛋白の翻訳やフォールディングが正しく行われていたものと思われる。しかし、細胞外では抗原が確認できず、今回用いた遺伝子領域では粒子形成ができない、もしくは効率が極めて低いと考えられる。細胞外への抗原放出量は、DNAワクチンの免疫誘導効率に大きく影響するため、改良する必要がある。たとえば、細胞外への抗原放出量を高めるためにシグナル配列を挿入する工夫などである。

CHIKVはアジア型、ECSA（東・中央・南アフリカ）型、西アフリカ型、インド洋型の遺伝子型に分類されるが、アミノ酸配列はほぼ同じであり、ワクチン株と感染したウイルス株との遺伝子型の違いによる影響は無いと言われている。本研究ではアジア型のBaH306株、ECSA型のS10571およびS27株を用いた。今後、誘導された免疫が他の株に対しても有効であるかどうかを検討する必要がある。

媒介蚊となるヒトスジシマカの生息地域は広く、輸入症例からのCHIKV分布域の拡大が懸念されるため、迅速かつ安価なワクチン製造が可能であるDNAワクチンは有用と考えられる。

E. 結論

CHIKVの3株を用いてDNAワクチンを試作した。いずれも細胞内にCHIKV抗原を発現することを確認した。

F. 健康危険情報

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：昆虫細胞を用いたデング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.

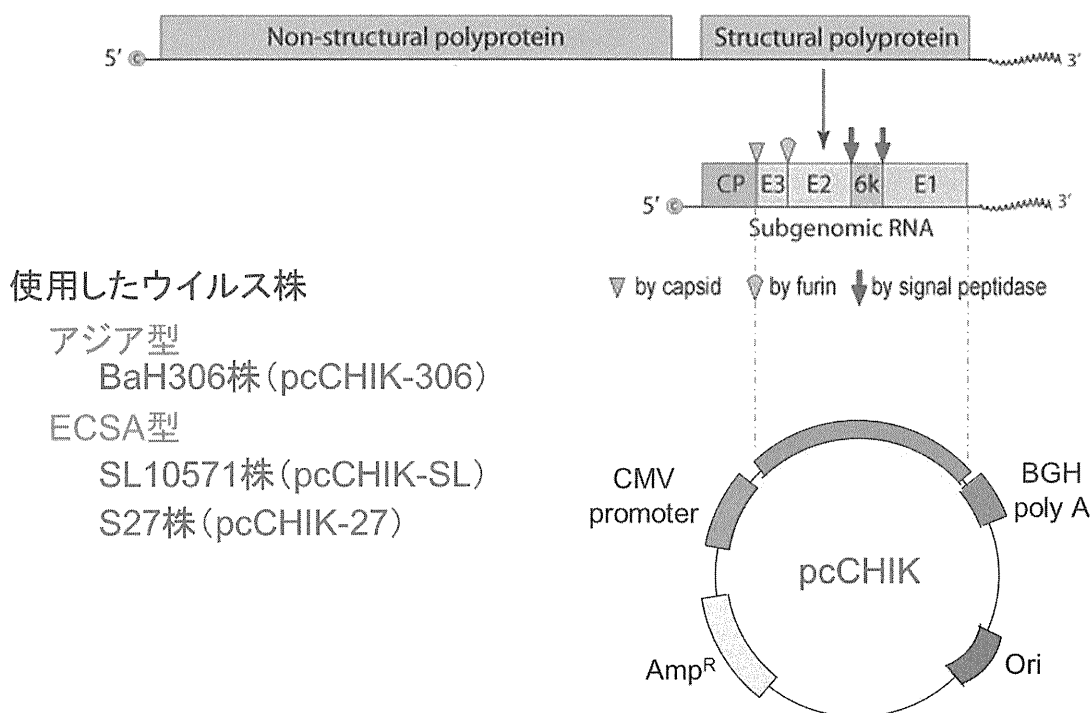
H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

表 1 RT-PCRに用いたプライマー配列

ウイルス株		配列 (5'-3')
BaH306	sense	CGCGGATCCACCATGAGTCTTGCCATTCCAGTTATG
	anti-sense	TGCTCTAGATTA AAAACGACACGCATAGCACCAC
S10571	sense	CGCGGATCCACCATGAGTCTTGCCATCCCAGTTATG
	anti-sense	TGCTCTAGATTA GAACGACACGCATAGCACCAC
S27	sense	CGCGGATCCACCATGAGTCTTGCCATCCCAGTTATG
	anti-sense	TGCTCTAGATTA GAACGACACGCATAGCACCAC

下線：制限酵素 (BamHIまたはXbaI) 認識配列



使用したウイルス株
 アジア型
 BaH306株 (pcCHIK-306)
 ECSA型
 SL10571株 (pcCHIK-SL)
 S27株 (pcCHIK-27)

図 1. DNAワクチンの作製。CHIKVの構造蛋白領域のE3 からE1 までをpcDNA3 ベクターに組み込んだ。

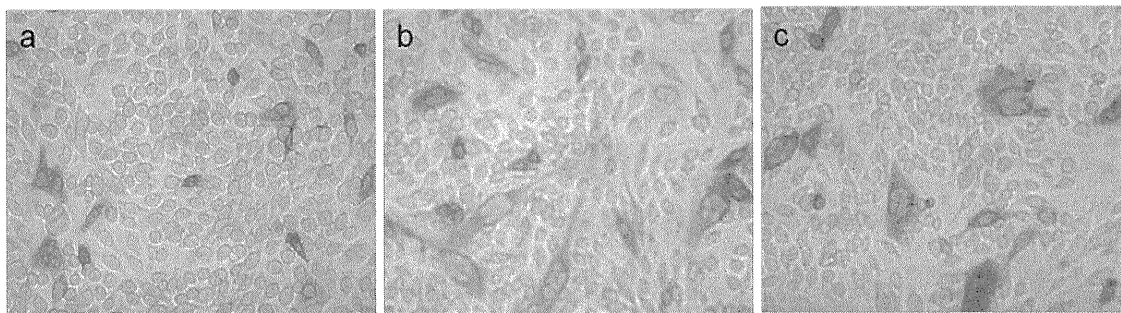


図 2. CHIKV抗原の細胞内発現。CHO細胞に(a)pcCHIK-306、(b)pcCHIK-SL、(c)pcCHIK-27を導入し、24時間後にCHIKVに対するウサギポリクローナル血清を用いて免疫染色を行った。

DENV キメラ prM/E VLP の発現

研究分担者 高橋秀宗 国立感染症研究所 感染病理部

研究要旨 温暖化により猛威をふるい、日本侵入が危惧されているデングウイルス感染症に対し、感染性ウイルスを用いないワクチンを作成し、小動物で効果を確認する。ウイルスゲノムを持たず、形態上ウイルスと同等のウイルス様粒子(VLP; Virus-Like Particle)の作成により、動物実験における中和抗体の誘導、抗体依存性感染増強の少ないこと、の二点を指標とする。

A. 研究目的

フラビウイルス最大の疾病を引起すデングウイルス(DENV)は4つの血清型を持ち、感染者の吸血蚊が媒介するヒトを宿主とするウイルスである。異なる型のDENVに再感染した場合致死性のデング出血熱を発症する。2010年海外帰国者の輸入デング症例は2009年の2.5倍以上の245例が報告されている。しかし、DENV 1~4型何れにも有効な4価ワクチンが必須であるため、未だワクチンは無い。

我々は日本脳炎ウイルスウイルス様粒子(JE-VLP)、ウエストナイルウイルスウイルス様粒子(WNV-VLP)産生によるワクチン開発に携わってきた。WNV prM-E 遺伝子持続発現系によるウイルス様粒子抗原の産生、およびJEV prM-E 遺伝子持続発現系によるVLP抗原の産生を利用して、デングウイルスサブユニットワクチン(DEN-VLP)の開発を目的とした。

B. 研究方法

JE-VLP、WNV-VLP産生によるワクチン開発を基礎としてデングウイルスワクチンの開発を進める。本計画を実施するうえでの設備・施設等は既に整備されている。

1. DENV 中和エピトープを含むフラビウイルスキメラ prM/E VLP 発現ベクターを5種作成し、ウエスタンブロットによって発現を確認した。
2. ウイルス分離・ウイルス増殖に汎用されている Vero 細胞を用いてウイルスストック

の調整を試みた。

3. 不活化 DENV 1~4 混合抗原でプレートをコートし、JEV-E 特異的・WNV-E 特異的単クローン抗体を対照にして、入手した4種の DENV 認識単クローン抗体の反応性を検討した。

(倫理面への配慮)

本研究の目的のために実施される動物実験計画は、各機関・研究所の動物実験委員会・研究倫理委員会への申請をもとに毎年度、倫理面も含めて審査・承認を受けて実施される。従って、本実験は「研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針」(文部科学省告示第71号 平成18年6月1日)に基づく研究施設の動物実験ガイドラインに則り、動物の保定法・麻酔の方法・接種法・飼育観察法など、実験動物に対しての苦痛を可能な限り軽減できる方法で実施し、実験終了後は承認を受けた何れかの方法による安楽死の処置を行なう。

C. 研究結果

1. DEN-VLP 発現ベクターの作成と発現確認: DENV 中和エピトープを含むフラビウイルスキメラ prM/E VLP 発現ベクターを5種作成し、ウエスタンブロットによって発現を確認した。
2. DENV ウイルスストックの調製: ウイルス分離・ウイルス増殖に汎用されている Vero 細胞を用いてウイルスストックの調整を