

図1 A地域の被接種者血清中のELISA抗体価

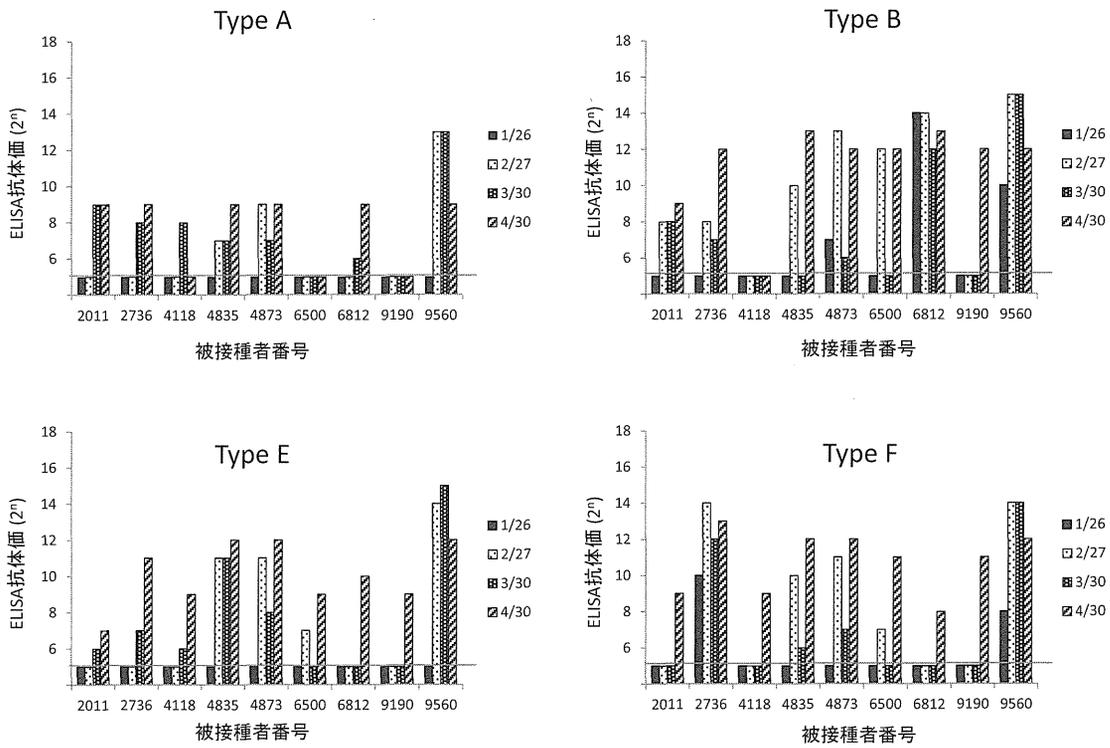


図2 B地域の被接種者血清中のELISA抗体価

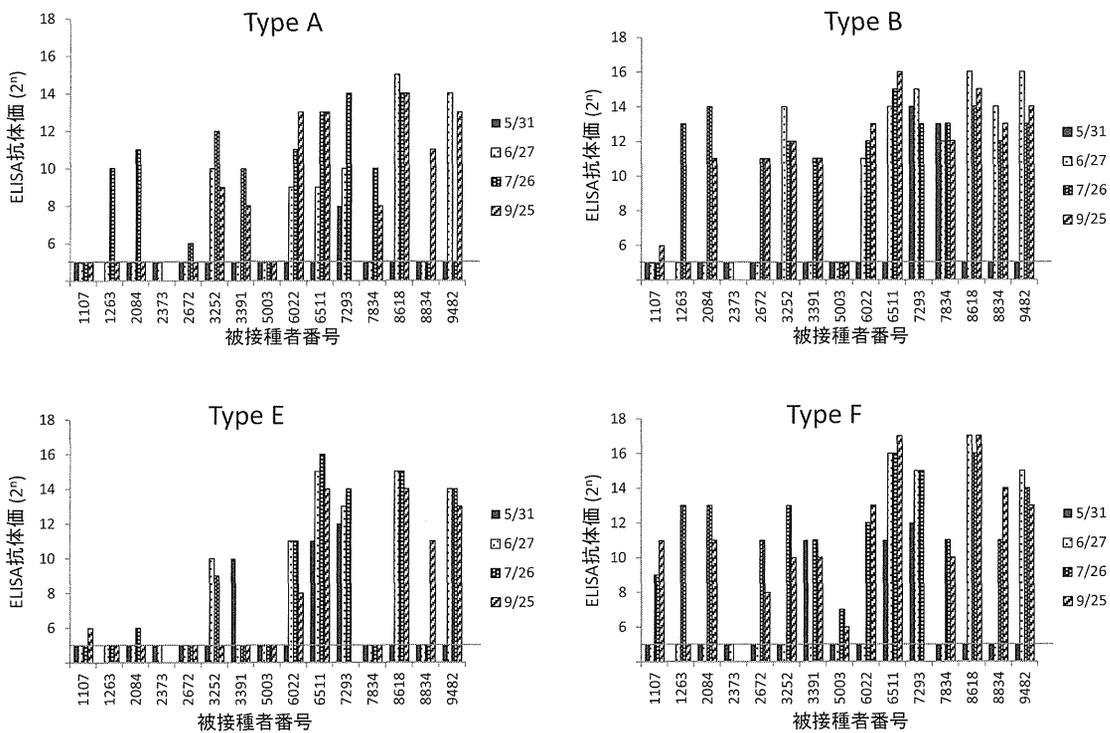


図3 C地域の被接種者血清中のELISA抗体価

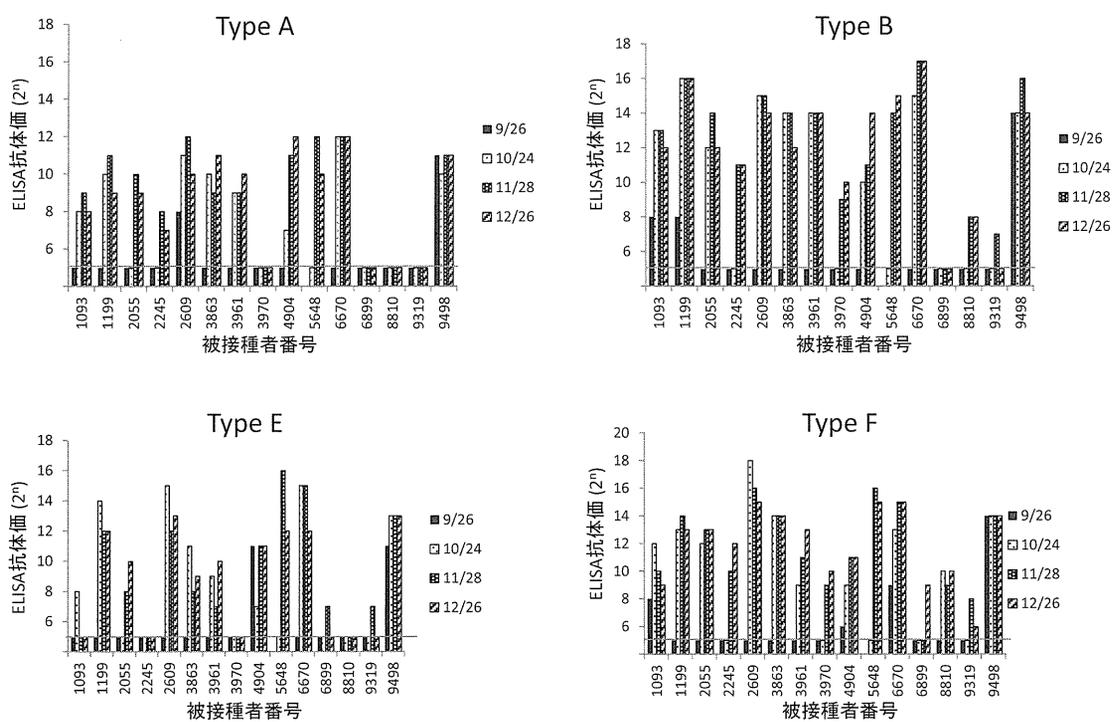


図4 D地域の被接種者血清中のELISA抗体価

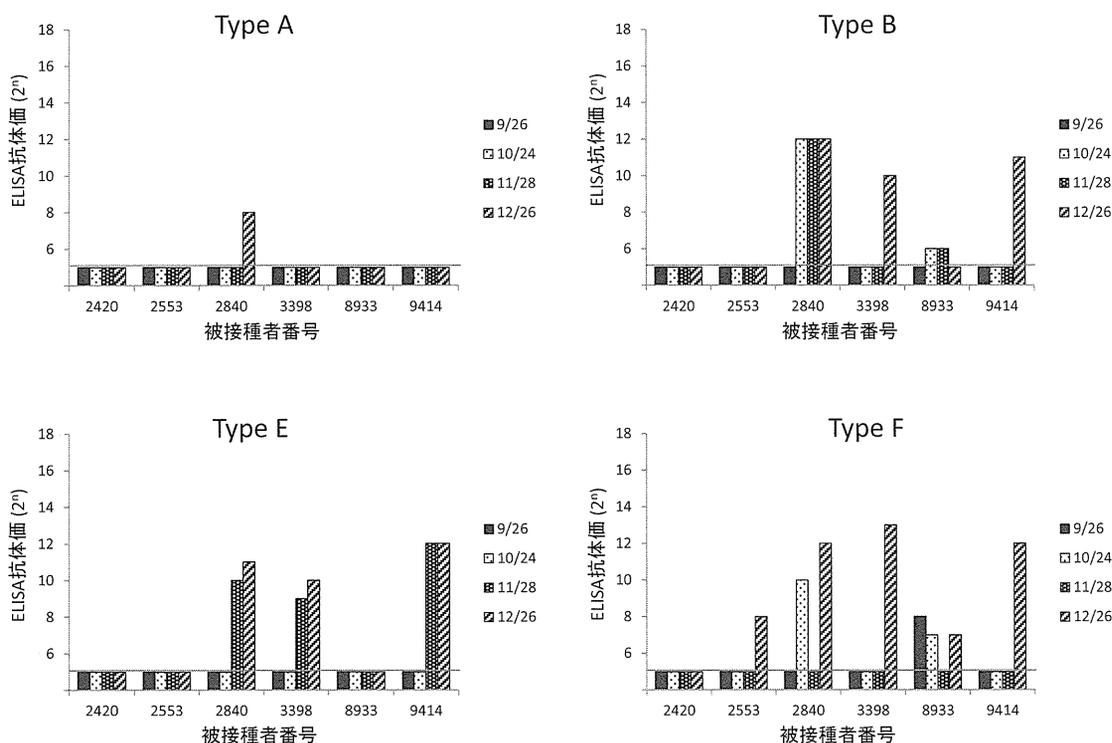


表7.

採血時期	接種前				1回接種後				2回接種後				3回接種後			
	毒素型				毒素型				毒素型				毒素型			
	A	B	E	F	A	B	E	F	A	B	E	F	A	B	E	F
2011	<6	<6	<6	<6	<6	8	<6	<6	9	8	6	<6	9	9	7	9
2736	<6	<6	<6	10	<6	8	<6	14	8	7	7	12	9	12	11	13
4118	<6	<6	<6	<6	<6	<6	<6	<6	8	<6	6	<6	<6	<6	9	9
4835	<6	<6	<6	<6	7	10	11	10	7	<6	11	6	9	13	12	12
4873	<6	7	<6	<6	9	13	11	11	7	6	8	7	9	12	12	12
6500	<6	<6	<6	<6	<6	12	7	7	<6	<6	<6	<6	<6	12	9	11
6812	<6	14	<6	<6	<6	14	<6	<6	6	12	<6	<6	9	13	10	8
9190	<6	<6	<6	<6	<6	<6	<6	<6	<6	<6	<6	<6	<6	12	9	11
9560	<6	10	<6	8	13	15	14	14	13	15	15	14	9	12	12	12

表8

採血回数	接種前				1回接種後				2回接種後				3回接種後			
	毒素型				毒素型				毒素型				毒素型			
	A	B	E	F	A	B	E	F	A	B	E	F	A	B	E	F
<6	9	6	2	3	6	2	4	1	9	5	3	0	7	4	5	0
≥6	0	3	7	6	3	7	5	8	0	4	6	9	2	5	4	9

表9

比較グループ		Steel-Dwass 多重比較検定の p 値(有意確率)			
		毒素型			
		A	B	E	F
3回接種後	2回接種後	0.25275	0.25275	0.12212	0.49325
3回接種後	1回接種後	<u>0.00555</u>	0.79311	<u>0.01864</u>	0.76552
3回接種後	接種前	<u>0.01864</u>	0.08715	<u>0.00022</u>	<u>0.00555</u>
2回接種後	1回接種後	0.25275	0.76552	0.79311	0.96806
2回接種後	接種前	0.51548	0.92746	0.05161	0.12212
1回接種後	接種前	0.95640	0.41691	0.25275	0.05161

高効率にC型肝炎ウイルス感染を阻止できる 中和抗体の開発とその解析

国立感染症研究所ウイルス第二部
脇田 隆字

研究要旨 輸血用血液および血液製剤のスクリーニングが可能となって、HCVの新規感染者数は減少したが、医療従事者やウイルスキャリアの家族などハイリスクグループは感染リスクがある。従って、針刺し事故などの際に免疫グロブリンによる感染予防が望まれている。また、HCV感染による肝不全に対する肝移植時にも感染中和活性の高い免疫グロブリン投与により再感染のリスクの軽減が期待できる。本研究ではHCVに対する中和活性の高い抗体を取得する。さらに、得られた抗体の感染中和阻止機構を解析することにより、感染初期過程を詳細に解明することが可能となる。

研究分担者

- (1) 東レ株式会社医薬研究所
中村 紀子
- (2) 昭和大学医学部
伊藤 敬義
- (3) 東京医科歯科大学
朝比奈 靖浩
- (4) 株式会社抗体研究所
篠原みどり
- (5) 国立感染症研究所
Hussein Hassan Aly

A. 研究目的

C型肝炎ウイルス(HCV)感染者の多くが持続感染化し、慢性肝炎となり、10-30年後に肝硬変・肝臓癌に至る重大な感染症である。現在インターフェロン及びリバビリンによる治療が行われているが、最近プロテアーゼ阻害剤が製造承認され、治療効果の改善が期待されている。輸血用血液および血液製剤のスクリーニ

ングが可能となって、HCVの新規感染者数は減少したが、一方で、医療従事者やウイルスキャリアの家族などハイリスクグループは潜在的な感染リスクがある。従って、針刺し事故などの際に免疫グロブリンによる感染予防が望まれている。また、HCV感染による肝不全に対する肝移植は患者に経済的、肉体的に大きな負担となるが、常に再感染のリスクがあり、再感染時には肝病変が急速に進行し重症化する場合がある。肝移植時にも感染中和活性の高い免疫グロブリン投与により再感染のリスクの軽減が期待できる。

HCVにはウイルス培養系が存在しなかったため、感染中和抗体の解析が進んでこなかった。しかし、2005年に申請者の研究グループが世界に先駆けてHCVのウイルス培養系を樹立したことにより、HCVの基盤的研究が飛躍的に進んだ。HCVキャリアの血液中に中和抗体が存在すること、ウイルスのE2蛋白質に対するモノクローナル抗体の中に感染中和活性を持つものがあること。さらにヒト肝細胞キ

メラマウスに対するHCV感染を防御することが可能であることが明らかとなってきた。また、平成22-23年度の政策創薬総合研究においてHCVに対するヒト型感染中和抗体を開発した。本研究ではこれまでの研究を発展させて、HCVに対するさらに中和活性の高い抗体を取得する。ファージライブラリー、リンパ節移植法、KMマウス、ウサギモノクローナル抗体などにより、複数の感染中和抗体を樹立することを目標とする。さらに、得られた抗体の感染中和阻止機構を解析することにより、感染初期過程を詳細に解明することが可能となる。

感染中和抗体の有効性および感染阻止機構の解析は培養細胞系でおこなう。生体での有効性については、HCV感染感受性のあるヒト肝細胞移植キメラマウスにより検証可能である。

B. 研究方法

1. リコンビナントHCV E2タンパク質の解析

膜貫通領域を欠失した分泌型のE2(384-714)の発現プラスミドをハエ由来S2細胞に遺伝子導入しE2タンパク質を作製した。アフィニティ精製およびゲル濾過による精製後、分子量、精製度について銀染色で確認した。精製E2蛋白質による感染阻害活性をHCVppおよびHCVccにより検討した。感染阻害活性を確認した精製E2蛋白質を用いて、結合する環状ペプチドをスクリーニングした。スクリーニングにより得られた4種類の環状ペプチドによるHCV感染阻害を解析した。

2. HCV E2タンパク質抗原で刺激したマウスリンパ節を移植したSCIDマウスのリンパ球から作製したハイブリドーマの解析

ストレプトアビジンタグ化E2タンパク質(HCV TH株、遺伝子型1b)をBalb/cマウスに免疫し、2週間後にリンパ節を採取した。リンパ節をSCIDマウスの腎皮膜下に挿入した。リンパ組織移植後、2週間おきに4回、E2タンパク質溶液を投与した。最終免疫の4日後に、SCIDマウスより脾細胞を採取・調製し、ハイブリドーマを作製に用いた。

3. Naïve B細胞における単クローン増殖(Clonality)解析及び遺伝子発現解析

C型慢性肝炎(CH-C)患者33例、健常人20例からPBMCを採取し、MACSを用いてナイーブBと非ナイーブB細胞に分画した。その後IgH遺伝子CDR3領域のRT-PCR産物を用いた単クローン増殖(Clonality)解析をIgM、IgG、IgA各クラスに対して行った。Clonalityの検出はキャピラリー電気泳動(ABI-3100)及び4%アガロースゲルで検出した。更にB細胞活性化関連遺伝子群CD80、CD86、CD69、CD71、CXCR3とAID、IFN感受性遺伝子(ISG)群であるOAS1、OAS2、MX1、ISGF3、IFITMのNaïve B細胞でのmRNA発現量をreal time RT-PCR法で測定した。

4. 蛍光タグ付加HCVを用いた細胞吸着分子の探索

JFH-1株のNS5AC末端へ蛍光蛋白を挿入し、T4290AとC7653Tに変異導入することで粒子産生能を保持した蛍光蛋白発現HCV(JFH1-EYFP mutant, JFH1-AsRed mutant)を構築した。この蛍光蛋白発現HCV感染細胞の培養上清を濃縮しスクリーニングに使用した。96 well plateにHuh7.5.1細胞を播種、翌日各種化合物を添加し、その2時間後にウイルス濃縮液を添加した。翌日

培地を交換し、5日間の培養後 high content analysis を利用した感染細胞数の定量解析を行った。レプリコンアッセイの結果と照合し、HCV 複製増殖阻害活性は示さないが感染阻害活性を示した化合物を、侵入阻害剤として抽出した。さらに、より感染効率がよく安定したアッセイ系を構築するため、JFH1より感染性ウイルス粒子産生能の高い J6/JFH1キメラウイルスと蛍光蛋白発現ウイルスの組替えウイルスを作成した。

5. 抗体ファージライブラリーからのHCV中和抗体の単離

昨年度までに HCV 罹患肝癌患者由来のリンパ球よりファージディスプレイ法によって HCV の感染を阻止する抗体を 3 種取得した。本年はこれら 3 種類の IgG 抗体の高発現株を樹立し、感染中和試験に使用した。さらに scFv 抗体の大腸菌発現ベクターを改変し、従来の 10 倍以上の発現効率の発現ベクターを構築した。この発現ベクターを使用し、感染中和評価用の scFv 抗体を大量に調製した。また、今年度新たに HCV 罹患患者由来のリンパ球から新規の抗体断片 (Single Chain Fv (scFv)) ファージライブラリーを作製した。昨年度までの中和抗体の取得実績から、中和抗体のスクリーニング用抗原には昆虫細胞発現系で調製しウイルス粒子上の立体構造を保持した E2 リコンビナントタンパク質を使用した。さらに、本共同研究内においてマウスの中和抗体が作製できたことから、同免疫方法によるウサギの中和抗体作製にも着手した。ウサギモノクローナル抗体は、通常ハイブリドーマ法による作製が困難であるため、ヒト抗体の作製で使用したファージディスプレイ技術を利用して実施した。今年度

は、ヒト中和抗体のスクリーニングに使用した抗原と同じ E2 リコンビナント抗原を免疫したウサギから免疫原に対して結合活性を持つ抗体を多数取得した。

6. 遺伝子型 4a の C 型肝炎ウイルス遺伝子の分離と解析

遺伝子型 4a の全長 HCV 遺伝子を患者血清から分離し、RT-PCR 法により増幅した。PCR で増幅した遺伝子断片をクローニングして、その塩基配列を解析した。さらにコンセンサス配列を用いて全長のウイルス遺伝子を結合して、サブジェノミックレプリコンおよび全長の HCV クローンを作製し、その複製増殖能を培養細胞で解析した。

(倫理面への配慮)

本研究計画の実験計画は所属施設に提出されその承認を得ている。取り扱うすべての DNA および病原性微生物に関しては適切な封じ込めレベルの実験施設で取り扱われる。取り扱うすべての DNA に関して組み換え DNA 実験計画を提出し承認を得ている。取り扱うすべての病原微生物 (感染性のウイルスを含む) に関しても取り扱い届けを提出し承認を得ている。ウイルスの遺伝子をクローニングした患者血清は、すべてその感染ウイルスの解析についてインフォームドコンセントを得て採取されている。ヒトの遺伝子解析を行う予定はない。

C. 研究結果

1. リコンビナント HCV E2 タンパク質の解析
ハエ S 2 細胞で発現させた精製 E2 タンパク質は、SDS-PAGE 解析で還元状態では約 60 kDa

の単一の分子量を示した。非還元状態では約 60 kDa の単量体とともに二量体および多量体と考えられるバンドを観察した。そこで、ゲル濾過法によりさらに単量体分画と単量体と二量体を含む分画に分離した。それぞれの分画の精製 E2 蛋白質は HCVpp および HCVcc 感染系とともに感染阻害活性を示した。単量体分画の E2 蛋白質を用いて RAPID system により結合する環状ペプチドをスクリーニングした。本スクリーニングは東京大学の菅研究室でおこなわれた。スクリーニングの結果 4 種類の E2 蛋白質結合ペプチドを同定した。まずこの 4 種類の環状ペプチド (P1, P2, P3, P4) の HCVpp および HCVcc 感染系における HCV 感染阻害活性を解析した。P1 および P2 は感染阻害活性を示したが、P3 および P4 は阻害しなかった。P1 の EC50 は約 4 μ M、P2 は約 12 μ M であった。レプリコン細胞による複製阻害実験では P1 と P2 はともにレプリコンに対して阻害活性を示さなかった。従って、P1 および P2 ペプチドの HCV 感染阻害活性は初期感染過程に作用すると考えられた。さらに E2 蛋白質とレセプター分子の一つである CD81 の結合に対する阻害活性を解析したが、P1 および P2 ペプチドは結合を阻害しなかった。従って、環状ペプチドによる HCV 感染阻害はウイルスと CD81 分子の結合以外の過程に作用すると考えられた。

2. HCV E2 タンパク質抗原で刺激したマウスリンパ節を移植した SCID マウスのリンパ球から作製したハイブリドーマの解析

リンパ節移植法によって免疫した SCID マウスから得たハイブリドーマから EIA スクリーニングで特に強い値を示した well から 16 ク

ローンを選定し、このうち 9 クローンを単クローン化し、無血清培養し、培養上清を ProSepG (Millipore)にて精製した抗体を用いて、HCVpp (TH 株、遺伝子型 1b) の感染価を測定した。その結果、9 種類のモノクローナル抗体は中和活性を持たなかったことを報告してきた。今回、新たに 7 クローン (A~G) について単一化し、無血清培養後、モノクローナル抗体を精製した。精製抗体を用いて、HCVpp にて各抗体が感染阻害活性を持つかを確認した。その結果、2 つのクローンが感染阻害活性を持つことが明らかとなった。

次に、遺伝子型 1b の HCVpp に対して感染阻害活性を示す 2 つの抗体が遺伝子型 2a の HCVpp に対しても感染阻害活性を示すかについて検討した。その結果、2 つの抗体は濃度依存的に HCVpp の感染を阻害したが、感染阻害活性は遺伝子型 1b の HCVpp に対する方が強かった。

3. Naïve B 細胞における単一クローン増殖 (Clonality) 解析及び遺伝子発現解析

Naïve B 細胞には、CH-C 患者、健常人ともに Clonality は検出されなかった。非ナイーブ B 細胞には、CH-C 患者にのみ IgM 及び IgG クラスの Mono-clonality が確認された。遺伝子発現解析では CH-C 患者のナイーブ B 細胞において CD86、CXCR3 が高発現を示した。ISG 群の遺伝子発現解析では、CH-C 患者ナイーブ B 細胞では MX1 高発現が認められた。その他の遺伝子発現は健常者と差はなかった。更には CD86 と CXCR3 がいずれも高値である患者を B 細胞異常活性化群とし、非異常活性化群と比較すると、MX1、IFITM、IFGF3 が高値、また Clonality 検

出頻度も高い傾向を示した。これらの事実より CH-C 患者のナイーブ B 細胞は HCV 感染・吸着が高頻度で、ナイーブ B 細胞の非特異的異常活性化を惹起していると推察された。また B 細胞異常活性化が ISG 発現や自然免疫系シグナル伝達の機能に関連する可能性が示唆された。

4. 蛍光タグ付加 HCV を用いた細胞吸着分子の探索

JFH1-EYFP mutant、-AsRed mutant 導入後、培養上清中のコア抗原は親株 JFH1 と同等で最高値 1.35×10^4 fmol/l に達したが、T4290A, C7653T 変異を持たない wild type では経時的に減衰・消失した。HCV-RNA 導入細胞、及び再感染細胞ともに、mutant type はウイルス陽性細胞数が指数関数的に増加し最大速度は $10^{2.5}$ /日だった。抗 CD81 抗体を使用した侵入阻害試験では 80% 以上の感染が阻害された。以上より、蛍光タグ付き HCV はウイルス粒子産生能を保持しつつ継代が可能で、flowcytometry などを用いることにより感染細胞を定量的に検出することが可能であることが示された。High content analysis では、核周囲のウイルス蛋白染色を定量することにより簡便かつ迅速な蛍光蛋白発現細胞数の定量解析に成功した。1000 個の低分子化合物を用いたスクリーニングでは、48 個が 50% 以上の感染阻害効果を示し 6 個が濃度依存性に感染阻害効果を示した。これらの化合物は、レプリコンアッセイにおいて阻害活性を示さず、ウイルス侵入過程を特異的に阻害している可能性が示唆された。アッセイ系を改良するために新たに作成した J6/JFH1 キメラウイルスと JFH1-EYFP mutant の組替えウイルスも、感染性粒子産生能を保持することを確認した。大規模スクリーニングに応用を目指し、現在感染動

態の評価を行っている。

5. 抗体ファージライブラリーからの HCV 中和抗体の単離

昨年度までに取得した高い感染中和能を持つ 3 種類の抗体の IgG と scFv の感染中和の結果、1 クローンは GT2a HCVcc の IC50 が scFv 抗体が $0.02 \mu\text{g/mL}$ 、IgG が $0.17 \mu\text{g/mL}$ であり、1 価の scFv が 2 価の IgG の約 10 倍の中和活性を示した。他のクローンに関しては IgG 抗体の感染中和活性が高い結果となったが、scFv 抗体の安定性が悪く、scFv 抗体の失活の可能性があった。そこで、東レでこれら 3 クローンの IgG および scFv を PEG 化して、安定性、活性の向上を目指すこととなった。新規ヒトモノクローナル抗体については現在中和試験を実施中である。ウサギモノクローナル抗体についても現在中和試験を実施中である。

6. 遺伝子型 4a の C 型肝炎ウイルス遺伝子の分離と解析

遺伝子型 4a の HCV 遺伝子の分離を終了した。現在レプリコンの構築を終え、培養細胞に導入してコロニー形成実験を行っている。また、既報の ED43 株の遺伝子を手し、比較する予定である。

D. 考察

今年度の各分担研究内容は報告書に詳細に記載されている。以下に簡単に内容をまとめる。

HCV の E2 蛋白質は初期感染過程において宿主細胞表面のレセプター分子に結合する。本年度は E2 蛋白質に結合する環状ペプチドの探索と解析を行った。スクリーニングの結果 4 種類のペプチドが得られたが、そのうち 2 種類のペ

プチドは HCV 感染阻害活性を有することが明らかとなった。今後はこのペプチドの感染阻害機構に関する解析を進めるとともに、治療薬としての可能性も検討していく。

E2 タンパク質であらかじめ免疫したマウスからリンパ節を採取し、これを SCID マウスの腎皮膜下に移植し、移植後 2 度ブーストをかけることによって、SCID マウスにおいて抗 E2 抗体誘導が認められた。今回、作製したハイブリドーマの中から、遺伝子型 1b および遺伝子型 2a の HCV の感染を阻害する活性を持つ 2 つのクローンを得た。今後、種々の遺伝子型の E2 タンパク質への結合性、他の遺伝子型の HCVpp にて bNab であるかについて検討していく。

Naïve B 細胞の段階で CD69、CD71、AID が異常高値を示しており、この Naïve B 細胞が異常活性化 B 細胞となり、単一クローン増殖として検出されていることが推察された。異常活性化ポテンシャルの高い Naïve B 細胞、また異常活性化 B 細胞を持つ CH-C 患者の B 細胞性免疫が正常な免疫機能を有しているかを解析する必要がある。

蛍光タグ付き HCV の感染性を確認し、イメージアナライザーで蛍光発現ウイルス感染細胞の核周囲の蛍光蛋白量をデジタル化して定量的に評価することにより、感染細胞数を定量的かつ高効率に検出する測定系を構築した。さらにランダム化合物ライブラリーを用いた感染阻害化合物の一次スクリーニングにより侵入特異的阻害剤としての可能性を有する化合物を同定した。これらの化合物の作用機構の解明や構造活性相関解析を進めることにより、宿主因子を標的とした創薬への展開が期待される。

昨年度までに取得した 3 種類の抗体はいずれも GT2a HCVcc の IC50 は $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ 以下であり高い感染中和能を持っていることがわかった。また、同じクローンの IgG と scFv 抗体の IC50 を比較すると scFv の方が高い中和活性を示していたことから、低分子化することによってウイルスへのアクセシビリティ改善されたことにより中和活性も向上したと考えられる。

E. 結論

1. E2 蛋白質に結合する環状ペプチドを同定した。この中には感染阻害活性を有するものがあった。
2. HCV E2 タンパク質で免疫したリンパ節を SCID マウスの腎皮膜下に移植し、追加免疫後、SCID マウス由来脾細胞を用いて作製したハイブリドーマから遺伝子型 1b および 2a の HCVpp の感染を阻害する 2 つのモノクローナル抗体を取得した。これらの抗体は遺伝子型 1a、1b および 2a の E2 タンパク質に結合することから、broadly neutralizing antibody であることが期待される。
3. Naïve B 細胞の段階で CD69、CD71、AID が異常高値を示しており、この Naïve B 細胞が異常活性化 B 細胞となり、単一クローン増殖として検出されていることが推察された。
4. 蛍光蛋白発現 HCV 培養系を用いた High content screening assay を樹立し、侵入阻害剤としての可能性を有する低分子化合物を同定した。この新たなアッセイシステムは、HCV 生活環のあらゆるステップに対する阻害剤探索や薬効評価への応用が期待される。

5. 昨年度までに単離した中和抗体は1価の scFv 抗体の方が高い中和活性を持っており、scFv 抗体は治療用抗体の候補抗体構造の1つとなった。ただし scFv 抗体の保存安定性は極めて低いため、今後 scFv 抗体の安定性の向上を図る。共同研究参加者である東レで PEG 化を実施し、当社で抗体配列の改変による scFv 抗体の安定化を目指す。

6. 遺伝子型 4a の全長 HCV 遺伝子のクローニングに成功した。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Saeed M, Gondeau C, Hmwe S, Yokokawa H, Date T, Suzuki T, Kato T, Maurel P, Wakita T. Replication of Hepatitis C Virus Genotype 3a in Cultured Cells. *Gastroenterology*. 2013 144(1):56-58.

2) Date T, Kato T, Kato J, Takahashi H, Morikawa K, Akazawa D, Murayama A, Tanaka-Kaneko K, Sata T, Tanaka Y, Mizokami M, Wakita T. Novel Cell Culture-Adapted Genotype 2a Hepatitis C Virus Infectious Clone. *J Virol*. 2012 86(19):10805-20.

3) Date T, Morikawa K, Tanaka Y, Tanaka-Kaneko K, Sata T, Mizokami M, Wakita T. Replication and infectivity of a novel genotype 1b hepatitis C virus clone. *Microbiol Immunol*. 2012 56(5):308-17.

4) Inokuchi M, Ito T, Nozawa H, Miyashita M, Morikawa K, Uchikoshi M, Shimozuma Y, Arai J, Shimazaki T, Hiroishi K and Imawari M. Lymphotropic Hepatitis C Virus Has an

Interferon-Resistant Phenotype. *Journal of Viral Hepatitis* 19: 254-262, 2012.

5) Kiyohashi K, Kakinuma S, Kamiya A, Sakamoto N, Nitta S, Yamanaka H, Yoshino K, Fujiki J, Murakawa M, Kusano-Kitazume A, Shimizu H, Okamoto R, Azuma S, Nakagawa M, Asahina Y, Tanimizu N, Kikuchi A, Nakauchi H, Watanabe M: Wnt5a signaling mediates biliary differentiation of fetal hepatic stem/progenitor cells. *Hepatology* 2013; in press.

6) Nitta S, Sakamoto N, Nakagawa M, Kakinuma S, Mishima K, Kusano-Kitazume A, Kiyohashi K, Murakawa M, Nishimura-Sakurai Y, Azuma S, Tasaka-Fujita M, Asahina Y, Yoneyama M, Fujita T, Watanabe M. Hepatitis C virus NS4B protein targets STING and abrogates RIG-I-mediated type-I interferon-dependent innate immunity. *Hepatology* 2013; 57 (1): 46-58.

7) Aly HH, Shimotohno K, Hijikata M, Seya T. In vitro models for analysis of the hepatitis C virus life cycle. *Microbiology Immunology*; 56(1): 1-9, 2012.

8) Oshiumi H, Aly HH, Funami K, Matsumoto M, Seya T. Multi-step regulation of type I interferon induction by hepatitis C virus. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 2013 Epub ahead of print Jan 5

2. 学会発表および講演など

1) T Wakita. Hepatitis C Virus Replication Models and Anti-viral Development. The 25th International Conference on Antiviral Research (ICAR) Sapporo, Japan (2012, 4. 16-19)

2) T Wakita. Basic concepts of Hepatitis C, 1st

Asian Conference on Hepatitis B and C, HIV and Influenza, Beijing Marriott Hotel City Wall, Beijing, China (2012, 5. 18-19)

3) T Wakita. Production of cell culture adapted HCV strain, International Symposium on Viral Hepatitis and Liver Cancer, Peking University Center for Infectious Diseases Research, Beijing, China (2012, 6. 21)

4) T Wakita, T Date, S Kim, T Kato, Novel Cell Culture-Adapted Hepatitis C Virus Infectious Clone, 19th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. Palazzo del Cinema, Lido-Venice, Italy, (2012, Oct. 5-9)

5) Miyashita M, Ito T, Inokuchi M, Uchikoshi M, Shimozuma Y, Arai J and Imawari M. The detection of the hepatitis C virus in Naïve B cell leads to abnormal activation and the resistance to the interferon based therapy. The 10th JSH Single Topic Conference “Hepatitis C: Best Practice Based on Science” (Tokyo 2012.11.21)

6) Miyashita M, Ito T, Uchikoshi M, Shimozuma Y, Arai J, Nozawa H, Tomoe S, Morikawa K, Eguchi J and Imawari M. Abnormal activation of naïve B cells in patients with chronic hepatitis C. 62th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Disease (Boston 2012.11.11)

8) Akiko Kusano-Kitazume, Naoya Sakamoto, Yukiko Okuno, Kenichi Mori, Mina Nakagawa, Sei Kakinuma, Sayuri Nitta, Miyako Murakawa, Seishin Azuma, Yuki Nishimura-Sakurai, Akihiro Matsumoto, Masatoshi Hagiwara, Yasuhiro Asahina, Mamoru Watanabe. Antiviral effects

and action mechanism of novel N-(morpholine-4-carboxyloxy) amidine compounds against hepatitis C virus. 63th. Annual Meeting of American Association for the Study of Liver Diseases, 2012, Boston, MA.

9) Yasuhiro Asahina, et al. Impaired IL28B gene induction and poor IL28B promoter activity influenced by the IL28B minor allele are closely associated with a null response to interferon in chronic hepatitis C patients. 63th. Annual Meeting of American Association for the Study of Liver Diseases, 2012, Boston, MA.

10) Miyako Murakawa, Yasuhiro Asahina, Naoya Sakamoto, et al. Impaired IL28B gene induction and poor IL28B promoter activity influenced by the IL28B minor allele are closely associated with a null response to interferon therapy in chronic hepatitis C. HCV Meeting 2012, Venice, Italy.

11) Nitta S, Asahina Y, Sakamoto N et al. Hepatitis C virus NS4B protein targets STING and abrogates RIG-I-mediated type-I interferon-dependent innate immunity. HCV Meeting 2012, Venice, Italy.

12) Asahina Y, Murakawa M, et al. Association of gene expression involving innate immunity and IFN signaling with genetic variation in IL28B in patients with chronic hepatitis C. JSH Single Topic Conference 2012.

13) Asahina Y, Tsuchiya K, Muraoka M, Tanaka K, Suzuki Y, Tamaki N, Hoshioka Y, Katoh T, Yasui Y, Hosokawa T, Ueda K, Nakanishi H, Itakura J, Takahashi Y, Kurosaki M, Izumi N. Suppression of Alpha-fetoprotein by Interferon

Therapy Reduces The Risk of Hepatocarcinogenesis in Patients with Chronic Hepatitis C. EASL The International Liver Meeting 2012, Barcelona, Spain.

14) Aly HH, Watashi K, Watanabe N, Kato T, Wakita T. Construction of Hepatitis C virus genotype 4a clone. 19th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. Palazzo del Cinema, Lido-Venice, Italy, (2012, Oct. 5-9)

15) Aly HH, Shimotohno K, Wakita T, Oshiumi H, Seya T. HCV particles production from mouse hepatocytes. 19th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. Palazzo del Cinema, Lido-Venice, Italy, (2012, Oct. 5-9)

16) Abe Y, Aly HH, Imamura M, Wakita T, Shimotohno K, Chayama K, Hijikata M. Thromboxane A2 synthase plays a key role in production of infectious HCV particles. 19th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. Palazzo del Cinema, Lido-Venice, Italy, (2012, Oct. 5-9)

17) Watanabe N, Date T, Aly HH, Aizaki H, Wakita T. Neutralization antibody induction by immunization with E2 proteins purified from different cells. 19th International Symposium on Hepatitis C virus and related viruses, Venice, Italy, October 2012.

18) Aly HH, Shimotohno K, Oshiumi H, Wakita T, Seya T. HCV particles production from mouse hepatocytes. The 34th Naito Conference, Sapporo, October 2012.

19) 伊藤敬義 C型慢性肝炎患者の免疫異常 第48回日本肝臓学会総会(金沢 2012. 6. 6) ラ

ンチョンセミナー

20) 宮下みゆき、伊藤敬義、井口桃子、打越学、下間祐、荒井潤、井廻道夫 C型慢性肝炎患者におけるナイーブ B 細胞の異常活性化 第48回日本肝臓学会総会(金沢 2012. 6. 7) 一般演題 (ポスター)

21) 打越学、伊藤敬義、井口桃子、下間祐、宮下みゆき、荒井潤、井廻道夫 IL28 マイナー genotype の C 型慢性肝炎患者における IFN 治療早期の補体反応性低下と IFN 治療法選択における血清 C3 動態測定的应用 第48回日本肝臓学会総会(金沢 2012. 6. 6) オープンワークショップ

G. 知的所有権の出願・登録状況

出願番号：特願2011-194082

発明の名称：C型肝炎ウイルスの増殖を抑制する医薬組成物

発明者：坂本直哉、渡辺守、北詰晶子、萩原正敏、奥野友紀子

特許出願人：東京医科歯科大学

提出日：平成23年9月6日

メタボロミクスを活用した統合失調症と気分障害の バイオマーカー開発

国立精神・神経医療研究センター神経研究所 疾病研究第三部
功刀 浩

研究要旨 気分障害、統合失調症、健常者の血液や脳脊髄液試料を収集しメタボライトについてバイオマーカーの可能性について検討した。drug free 患者 26 名の試料を収集した。統合失調症でベタインが、うつ病ではトリプトファンが有望であることを示唆する結果を得た。うつ病の EAP に関してはさらなる条件検討が必要である。

研究分担者

- (1) 東京大学大学院医学系研究科分子精神医学講座 岩本和也
(2) ヒューマン・メタボローム・テクノロジーズ株式会社 大橋 由明

A. 研究目的

本研究の目的は、メタボロミクスの技術を活用して、うつ病や統合失調症のバイオマーカーを開発することである。平成 23 年 7 月より精神疾患は 5 大疾病の 1 つに位置づけられたが、うつ病や統合失調症において実用化されている生物学的指標（バイオマーカー）は今のところない。客観的な診断や早期発見を可能にするためには、臨床や健診で役立つバイオマーカーを開発することは厚生労働行政上急務である。

国内外の他の研究では、ゲノムやトランスクリプトーム、プロテオーム解析によるバイオマーカー探索が本格化している。しかし、メタボローム解析による探索は未だに少ない。委託申請者／分担研究者のヒューマン・メタボローム・テクノロジーズ(HMT)社は、独自開発した技術による CE-MS 法によるメタボローム解析により、うつ病、糖尿病性腎症、

非アルコール性肝炎、インフルエンザ脳症、大腸がん等の血液バイオマーカーの発見に成功している。うつ病に関しては、エタノールアミンリン酸(EAP)が有力なバイオマーカーであることを世界で初めて見出し(感度 82%、特異度 95%)、新聞にも報道された。また、分担研究者の岩本ら(東京大学)も、HMT 社と共同で統合失調症の血漿試料のメタボローム解析を行い、ホモシステイン酸代謝経路の異常を検出し特許を申請している。そこで、本研究はこれらの独創的な知見について非常に多数のサンプルで検証し、臨床での有用性について詳細な検討を行い実用化をめざす(主に 24 年度)。また、これらのほかに、網羅的メタボローム解析を行い、統合失調症やうつ病の新たなバイオマーカーを見出す。

B. 研究方法

① サンプル収集

国立精神・神経医療研究センターでは、既に非常に多数の血液検体、脳脊髄液検体が収集されているが、drug free の患者の検体が少ないという問題があったこともあり、さらに検体収集を行った。

②EAP 濃度の測定

統合失調症 76 名、双極性障害 30 名、うつ病 96 名、気分変調症 8 名、健常者 70 名、その他 2 名の血漿サンプルの測定を行った(合計 282 名)。血漿を限外ろ過法により除タンパク質処理し、陰イオン交換カラムによるイオンクロマトグラフィー蛍光検出法 (IC-FLD 法) にて濃度を測定した。

③アミノ酸の解析

アミノ酸は、メタボライトのうち、神経伝達物質の原料になることもあり、精神疾患のバイオマーカーとなる可能性が指摘されている。そこでわれわれは、96 名のうつ病患者と 83 名の健常者を対象として必須アミノ酸の 1 つトリプトファン (セロトニンの原料となり、キヌレニン経路に関与する) に注目した解析を行った。

④統合失調症の解析

分担研究者の岩本らは、統合失調症の血液においてベタインなどの分子について CE-TOFMS 法によるメタボローム解析を行った。詳細は、分担研究報告書を参照されたい。

(倫理面への配慮)

本研究では、精神疾患患者、健常対照群を対象とした臨床研究や遺伝子解析研究を行う。生体内分子に関するデータや臨床情報を用いた研究は、個人情報の漏えいなどの危険性があるため、臨床研究に関する倫理指針を遵守した研究計画書を作成し、倫理審査委員会において承認を受けた上で研究を行っている。遺伝子解析研究は、試料提供者およびその血縁者の遺伝的素因を研究するため、その取り扱いによっては、さまざまな倫理的、社会的問題を招く可能性がある。したがって、文部科学省、厚生労働省、経済産業省告示第 1 号の「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」を遵守した研究計画書を作成し、各研究施設

での倫理審査委員会において承認を受けた上で研究を行っている。また、文書を用いた試料提供者への説明とインフォームド・コンセント、個人情報 の 厳 重 な 管 理 (匿 名 化) な ど を 徹 底 し て い る 。 分子生物学的機能解析を行うための動物実験についても研究機関の倫理委員会の審査を経て行っており、動物愛護の精神に則り苦痛を最小限にするなどの必要な処置を講じている。

C. 研究結果

①サンプル収集

24 年度には統合失調症圏 42 例、双極性障害 26 例、うつ病 51 名、健常者 48 名、その他 2 名 (計 169 名) 血液サンプルを収集した。そのうち、向精神薬の投与を受けていない drug free の患者は、統合失調症圏 7 名、双極性障害 3 名、うつ病 16 名 (計 26 名) 収集することができた。

②EAP 濃度の測定

1 名の統合失調症患者の血液を除いて、測定結果を得た。性、年齢を統制した ANOVA による解析では、うつ病と健常者との比較において、有意差が得られなかった。

EAP $\leq 1.5\mu\text{M}$ の頻度は、統合失調症 41%、うつ病 44%、健常者 37%であった。うつ病に多い数字であったが、有意差は認められなかった。

③アミノ酸の解析

うつ病患者では、健常者に比べて血漿トリプトファン濃度が有意に低かった ($p < 0.05$)。トリプトファン濃度が $50\mu\text{mol/L}$ の頻度もうつ病患者が健常者と比較して有意に多かった ($p < 0.05$)。

④統合失調症の解析

詳細は分担研究報告書に記載。

D. 考察

サンプル収集は比較的順調に進み、16人の drug free うつ病患者を収集できたことは大きな収穫であり、今後、貴重な試料となる。

EAPについては、先行結果を支持する結果が得られなかったが、今回のサンプルは過去に収集したサンプルを中心に解析したため、血液処理の条件が異なる。従って、血液サンプル収集時の条件を厳しくして検討する必要がある。

アミノ酸の解析では、トリプトファンの濃度が低かった。そこで、25の先行研究のメタアナリシスを行ったところ、大うつ病のトリプトファン値は健常者と比較してやはり低い結果であった($p < 0.000001$)。以上から、血漿中トリプトファンはうつ病のバイオマーカーとなり得るメタボライトとして有望であることが示唆された。

統合失調症に関する解析では、ベタインの濃度減少が再現され、バイオマーカー候補として有望であることがさらに支持された。今後、投薬の影響や重症度との関連について検討する価値がある。細胞内エピジェネティクス環境の制御に関わっている可能性もあり、ベタイン濃度変化とエピゲノム変化についての関連についても探る価値がある。

E. 結論

気分障害、統合失調症、健常者の血液や脳脊髄液試料を収集しメタボライトについてバイオマーカーの可能性について検討した。drug free 患者26名の試料を収集した。統合失調症でベタインが有望であることを支持する結果を得た。血漿中トリプトファン値がうつ病のバイオマーカーとして有望である結果を得た。うつ病のEAPに関してはさらなる条件検討が必要である。

F. 研究発表

1. 論文発表

Nishioka M, Bundo M, Kasai K, Iwamoto K. DNA methylation in schizophrenia: progress and challenges of epigenetic studies. *Genome Medicine* 2012;4:96.

2. 学会発表

小川眞太郎、古賀賀恵、堀弘明、服部功太郎、功刀浩：うつ病における血漿中モノアミン関連遊離アミノ酸濃度に関する検討。第16回日本病態栄養学会年次学術集会、2013年1月12、13日

小川眞太郎、藤井崇、古賀賀恵、堀弘明、服部功太郎、功刀浩：うつ病患者における血漿中L-トリプトファン濃度の比較および先行研究のメタアナリシス。第34回日本臨床栄養学会・第33回日本臨床栄養協会第10回大連合大会、10月7日、東京

寺石俊也、尾関祐二、堀弘明、篠山大明、千葉秀一、山本宜子、田中治子、飯嶋良味、松尾淳子、川本由実子、木下裕紀子、服部功太郎、太田深秀、梶原正宏、寺田純雄、樋口輝彦、功刀浩：安定同位体を用いた呼気ガス検査の精神疾患における有用性の検討。第22回日本臨床精神神経薬理学会、第42回日本神経精神薬理学会、宇都宮、2012年10月19日

小池進介、岩本和也、文東美紀、高野洋輔、岩白訓周、里村嘉弘、永井達哉、多田真理子、夏堀龍暢、管心、笠井清登。初回エピソード統合失調症における末梢血血漿成分のメタボロミクス解析 第34回日本生物学的精神医学会 2012/9/28-30 神戸国際会議場・兵庫

G. 知的財産研の出願・登録状況

1.特許取得

該当なし

2.実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

フラビウイルス粒子様ワクチンの開発

国立感染症研究所 感染病理部
長谷川 秀樹

研究要旨 東南アジアの大流行で輸入症例が急激に増加し我国への侵入が危惧されるデングウイルス(DENV)についても、「表面はウイルス粒子と同等で内部にウイルスゲノムを持たない非感染性VLP(Virus-Like Particle)」を、日本脳炎ウイルス(JEV)・ウエストナイルウイルス(WNV)VLP 研究で培ってきた我々の新技術[特許第 4268384号、特許第 5027106号]で構築し、「感染性ウイルスを用いず/特殊な封じ込め施設も不要な」安全/安価な製造を担保するフラビウイルス粒子様ワクチン抗原に開発することを、前期官民共同研究から継続して推進した。

マッチング研究1年目の本年度は、1)DENV1~4型ウイルス価を定量できる plaque/focus assay 法を確立した。2)DENV1~4型の prM/E 蛋白質を定量できる DENV 抗原 ELISA 法を単クローン抗体を組合せて樹立し、本法が感染性 DENV 粒子も感度良く検出できる事を見出した。3)研究組織 JNC の Cellufine カラム法と Sephacryl ゲル濾過法の組合せで、効率良い粒子様抗原精製法の確立が示唆された。4)種々にデザインした DENV 中和 epitope domain を含む prM/E VLP 発現ベクターの一過性発現系で、新たに以下の興味深い成績が得られた：①DENV prM-E の発現・分泌に他のシグナル配列が有効に作用する。②分泌された DENV 抗原では E と prM が相互作用をしている。③DENV E の膜貫通 domain は他の膜貫通 domain と置換可能である。④DENV 主要中和 domain は他の prM-E ベクター系のバックグラウンド下でも発現可能である。

研究分担者

- | | |
|-----------------------|----------------------|
| (1) 国立感染症研究所・感染病理部 | 小島朝人
鈴木忠樹
飛梅 実 |
| (2) 社会医療法人財団大和会武蔵村山病院 | 高橋秀宗 |
| (3) (一財) 阪大微生物病研究会 | 五味康行 |
| (4) JNC 株式会社 | 畠山昌和 |

A. 研究目的

我国侵襲の恐れがあるウエストナイルウイルス(WNV)も、温暖化で再燃が危惧される日本脳炎ウイルス(JEV)も、JE血清型群の極近縁なフラビウイルスで、中間増幅動物(トリ、ブタ等)を吸血した感染蚊が媒介して最終宿主のヒトに重篤な疾病を引き起こす。しかし、何れもワクチンによる予防が可能である。研究組織の微研会により新不活化 JE ワクチンが世界に先駆けて開発(2009年2月認可)され、次いで細胞培養不活化 WN ワクチンも開発されつつ

ある。

一方、フラビウイルス最大の疾病を引き起こすデングウイルス(DENV)はヒトを自然宿主とするウイルスで、4つの血清型を持ち、感染者の吸血蚊がヒトからヒトへウイルスを媒介する。異なる血清型の DENV に再感染した場合致死性のデング出血熱を発症する。東南アジアの人口密集地(都市部)で流行を起こしており、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価ワクチンが必須なため、DENV ワクチンは欧米を中心に開発中であるものの、未だ有効なワクチンが無い。

我々は委託企業・微研会との官民型共同研究で、「表面はウイルス粒子と同等で内部にウイルスゲノムを持たない非感染性ウイルス様粒子(VLP: Virus-Like Particle)」産生技術の開発に、JEV[官民共同:特許第 4268384号(2009.2.27)、特許第 5027106号(2012.6.29)]、及び、WNV[官民共同:

特願 2009-540109、等]について成功を収めてきた。

そこで、DEN-VLP ワクチンについても我々独自の
本技術を用いて官民共同で前期から引続き開発研
究を継続した。また、DEN-VLP に限らず全てのフラ
ビウイルス粒子様ワクチン開発に必須となる粒子
抗原精製法を、研究組織 JNC と連携して検討した。

B. 研究方法

微研会及び JNC との連携/共同研究体制の強化を
基に開始していた DEN-VLP 開発研究を継続して推
進し、以下の検討を加えた。

感染性 DENV 1~4、不活化 DENV 抗原、単クローン・
ポリクローナル抗体、DEN-VLP 発現ベクター：これ
ら研究基盤となる実験素材については、供与材料、
市販品、共同研究で独自に樹立した抗体・構築した
ベクター等で、既に報告したものをを用いた。

DENV の plaque 法・focus 法によるウイルス価の定
量：Vero 細胞に DENV を接種後、2% FBS を含む 1%
メチルセルロース-MEM 培地で培養した。培養 2~6
日に 10%ホルマリン、4%パラホルムアルデヒド(PFA)、
又はエタノールで細胞を固定した。水洗後メチレン
ブルー染色(plaque assay)、或いは 4 種の抗-DENV
単クローン抗体と HRP 標識した抗-マウス IgG 抗体
を用いた間接免疫染色(focus assay)を行った。

DENV 抗原検出サンドイッチ ELISA の樹立：抗-DENV
単クローン抗体(2 mg/mL)を段階希釈して ELISA プ
レートにコートした。次に、段階的に希釈した市販
の不活化 DENV 抗原をアプライして、捕捉された抗
原を HRP 標識抗-DENV 単クローン抗体で検出した。
検出抗体による非特異発色を生じた場合には、種々
のブロッカーを用いてコーティング後或いは抗原
アプライ後におけるブロッキングの必要性を検討
した。

感染 Vero 細胞、prM/E VLP 発現ベクター導入 293T
細胞培養上清中の DENV 抗原の定量：上記の検討で
最適化されたサンドイッチ抗原 ELISA 法の条件を
用いて、DENV 感染 Vero 細胞或いは DEN-VLP 発現ベ
クターをトランスフェクトした 293T 細胞から培養
上清中に放出された DENV 特異的 E 蛋白質或いは prM
蛋白質量を定量した。

VLP 抗原精製法の比較：WN-VLP ベクターを導入した
293T 細胞培養上清を VLP 抗原材料に用いて、既に
報告した蔗糖密度勾配遠心法を、次いで、Cellufine
Sulfate カラム法を検討した。ゲル濾過法の担体には、
以前報告の Sephacryl S-300 を用いた。また、
これらの方法 2 つを組合せて精製度を比較した。分

画された各フラクションの WNV 抗原価を 402 単ク
ローン抗体を用いた WNV 抗原 ELISA (微研会) で測定
し、ピーク画分を電子顕微鏡で観察して精製効果を
判定した。

(倫理面への配慮)

本研究における動物実験は、「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)に基づき、感
染研における動物実験委員会の承認後に実施する。

C. 研究結果

Plaque 法・Focus 法による DENV ウイルス価定量法
の確立：前期においては感染性 DENV 量を市販の NS1
イムノクロマト法で便宜的に推定していた。しかし、
これは本来定量的な測定法ではない。そこで、今年
度は plaque 法或いは focus 法によるウイルス価定
量法の確立を行った。細胞は前期ウイルスストック
を調製する際に CPE が観察された Vero 細胞を用い
た。ウイルスストックの 10 倍段階希釈液を接種後
CPE が観察され始める 2 日目から 6 日後まで経時的
に 10%ホルマリンで細胞を固定後染色した。その
結果、比較対照に用いた JEV の plaque 形成から 24
時間以上遅れて DENV plaque は出現し、JEV plaque
が融合して定量性が損なわれる 5 日後にカウント
に最適なサイズの plaque が DENV 1~4 型の何れに
も形成された。

他方、4% PFA 又はエタノールで固定した Vero 細
胞を 4 種の抗-DENV 単クローン抗体(ATCC 由来：前
期報告)で免疫染色した場合、CPE が観察される 2
日目から感染細胞の focus が認められた。Focus は
順次拡大し、感染 5 日目では形成された plaque が
クレーター状に染色され、微小 focus と非特異染色
の誤判定が無いことから最適であった。用いた 3H5
抗体は DENV 2 のみを染色し、15F3 抗体は DENV 1
のみと微弱に反応したが、2H2 と 4G2 抗体は 4% PFA
固定の場合 DENV 1~4 何れの感染 focus/plaque も
良好に検出した。しかし、エタノール固定では 4G2
が DENV 2 を強染色したものの、他の DENV との反応
性は減弱し、2H2 も DENV 2 検出のみに限定された。

調整したウイルスストックを plaque/focus 両法
で測定したところ、測定法による違いはなくウイル
ス価は同等であった。

DENV 抗原検出サンドイッチ ELISA の樹立：市販の
不活化 DENV 抗原を標準抗原に用いて、DENV 1~4
抗原を測定できるサンドイッチ ELISA 系の樹立を
試みた。4 血清型何れの DENV にも反応性を示した

4G2, 2H2 抗体を固層化抗体に使用した場合、両抗体とも 2 µg/mL 以上の濃度で捕捉抗原量はほぼ飽和状態に達した。次に、HRP 標識した抗体を調整し、検出抗体としての活性を検討したところ、2H2 抗体は 2 µg/mL で十分な検出活性を示したものの、4G2 抗体は 10 µg/mL でもプラトーに達しなかった。さらに高濃度で用いると非特異反応が顕著になり、ブロッキングを行うと感度の大幅な低下が認められた。しかし、10 µg/mL の HRP-4G2 でも OD=1.0 の吸光度が得られることから、通常の測定にはこの濃度を選択した。

市販の不活化抗原で設定した ELISA 系が、感染性 DENV 1~4 を定量的に検出できるか検討した。Vero 細胞にウイルスを感染後 5 日目まで継時的に培養上清を採取して、4G2:HRP-4G2 サンドイッチ ELISA で上清中の DENV 抗原量を測定した。その結果、CPE の出現に一致してウイルス抗原が検出され、4 日目にピークに達した。DENV 1~4 の最大 ELISA 抗原価は plaque 法で測定したウイルス感染価 (pfu/mL) と相関し、各血清型の増殖性とも一致していた。また、感染性 DENV は 2H2:HRP-4G2 や 4G2:HRP-2H2 のヘテロサンドイッチ ELISA、及び、2H2:HRP-2H2 ELISA 系でも検出でき、しかも 2H2 抗体を使用した ELISA 系においては約 3 倍程度高い感度を示した。

DENV prM-E 発現ベクターにより細胞外に放出される DENV 抗原の ELISA 解析：上記の検討で樹立された 4G2:HRP-4G2 (フラビウイルス E 蛋白質検出)、4G2:HRP-2H2 (E と結合している DENV prM 蛋白質検出)、及び 4G2:HRP-402 (WNV E 蛋白質検出；阪大微研会) ELISA 系を駆使して、前期報告した 5 種のフラビウイルスキメラ prM-E ベクターの発現で細胞外に放出されるキメラフラビウイルス抗原を調査した。まず、対照となる DENV シグナル配列 (ss)-prM-E を発現する DEN-VLP ベクター、及び、バックグラウンドとした異種フラビウイルス VLP ベクター (既に報告した WN-VLP ベクター) をトランスフェクトした 293T 細胞は其々の prM/E からなるウイルス抗原を培地中に放出していた。また、ss と E の膜貫通領域を異種に変換したキメラ DEN-VLP ベクターにおいても、培養上清中には DENV の E と prM から成る抗原が検出された。しかしながら、M から E の細胞外 domain まで、或いは、E の細胞外 domain のみが DENV に由来するキメラ DEN-VLP ベクターにおいては、何れの ELISA 系でも培地中にウイルス抗原を全く検出できなかった。これに対して、主要中和エピトープを構成している domain のみが

DENV に由来する異種 VLP ベクターでは、E 蛋白質を含むウイルス抗原が細胞外に放出されていた。

VLP 抗原精製法の比較：WN-VLP 濃縮液から平衡蔗糖密度勾配遠心法で VLP の精製を行ったが、ピーク画分には VLP と共に濃縮された不定型な微小構造物が大量に観察された。Cellufine Sulfate カラム法では 1.0M NaCl/Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.5) で溶出した VLP 抗原は約 10 倍濃縮され、微小不定型構造物の混入も減少した。しかし、VLP と不定型構造物の割合は凡そ 1:4~1:5 と不純物の方が多量に認められた。そこで、原理の異なる 2 種の精製法の組み合わせを検討した。JE-VLP の精製に有効であった Sephacryl S-300 ゲル濾過後、分画された WN-VLP を蔗糖密度勾配遠心法で分離したが、VLP 画分中に混入する微小不定型構造物の割合は、Cellufine Sulfate カラム法単独の場合より寧ろ高くなった。そこで、ゲル濾過後 Cellufine Sulfate カラム法で分画してみたところ、VLP の回収率は向上したものの微小構造不純物の排除には不十分であった。ところが、ゲル濾過法と Cellufine カラム法の順番を逆にして、Cellufine カラム分画後に Sephacryl ゲル濾過を行った。その結果、VLP：不定型不純物の割合が ~2:1 と著しく改善された。

D. 考察

感染性ウイルスのウイルス価を測定することはウイルス研究の基本である。前期では元來定量性を欠くイムノクロマト法に依らざるを得なかったが、本年度 plaque 法と focus 法が確立されたことから、ウイルス感染実験が定量的になり、結果の信頼度も高めることができた。ちなみに前期調製した DENV 1~4 ウイルスストックの感染価は、1 型から順に 1.4×10^6 , 1.7×10^6 , 1.6×10^5 , 8.8×10^5 pfu/mL であった。3 型は Vero 細胞で継代馴化を試みたものの、未だに低い感染価であった。別の分離株への変更も考慮する必要がある。また、今後行うことになろう動物実験のためには、3 型以外も 10^7 オーダーのウイルスを調製できる工夫が必要であろう。

本年度の第 2 の成果である DENV 抗原検出サンドイッチ ELISA 系の樹立も研究の進展に貢献する成果であった。更には、DENV の prM-E 発現ベクターに由来する抗原だけでなく、感染性 DENV も検出できるため、定性的な NS1 イムノクロマト法、定量的なウイルス RNA の real-time RT-PCR 法に加えて、感染者血清中のウイルス定量法に発展する可能性を秘めている。ELISA 系を樹立した時点で感度を推

定したところ、計算上は $10^3 \sim 10^4$ pfu/mL の DENV を検出できる。発症した感染者の血液中ウイルス価はこれより高いことも報告されているため、更なる高感度化を図れば感染検査キットとして、或いは、血清型特異的単クローン抗体が導入できればウイルス型同定法にも応用可能であろう。典型的な副次的成果と思われる。

本年度における最大の成果は、DENV 主要中和エピトープを含む domain がフラビウイルスキメラ prM/E 抗原として細胞外に放出されることが強く示唆されたことであろう。我々が試みている抗原デザインのコンセプトは、「DENV 血清型交叉反応性の感染増強抗体を誘導しない(少なくとも誘導活性が低い)、血清型特異的 DENV 中和抗体の誘導活性を保持した、感染性の無いフラビウイルス様粒子抗原」を開発することである。致死性デング出血熱の原因と考えられる DENV 交叉反応性感染増強抗体エピトープは主に prM domain、次いで E の 2 量体形成に関与する domain と fusion domain に集中していることが報告されている。しかし、これらの領域は他のフラビウイルスとは交叉性が低いことも知られている。そこで、本研究では異種フラビウイルスの VLP ベクターとして我々が独自に開発した WN-VLP ベクターをバックグラウンドベクターに活用した。本年度抗原 ELISA 系の樹立に成功したことから、主要中和 domain のみが DENV に由来する異種 VLP ベクターで、DENV 中和エピトープを含むキメラ E 蛋白質の発現・放出を検出することに成功した。未だベクターは完全な最終 version ではなく、発現量の問題等を抱えているものの、現在解決に向けて研究を進めている。

以上の他にも、フラビウイルスの粒子形成機構について、prM 上流の分泌シグナル配列や E 蛋白質の膜貫通領域は異種フラビウイルスの相当領域と互換性があること、粒子形成の初期反応となる prM:E ヘテロ 2 量体形成に関与する E 蛋白質の相互作用標的 domain、等々、学術的にも興味深い新知見が得られつつある。

以前の研究で、WN-VLP の免疫原性が不活化ウイルス粒子抗原に劣った結果は、精製過程の蔗糖密度勾配遠心中に粒子構造が破壊され抗原性が低下したことが原因と考察された。実際、電子顕微鏡観察で微小な不定形膜構造物が遠心前より遠心後に増加していた。感染防御を担うウイルス中和 epitope は粒子形態を保持した粒子表面の高次構造に依存するため、粒子形態の崩壊と共に消失すると考えら

れる。従って、蔗糖密度勾配遠心法は JE-VLP 精製に有用でも WN-VLP の精製には不適である。そこで、昨年度有効性が示唆された Cellufine Sulfate カラム精製法を検討したところ、確かに WN-VLP 画分中の不定形構造物混入量は減少したが、精製抗原には未だ不十分であった。単独では不十分でも組合せて有用性が向上する可能性を検討したが、蔗糖密度勾配遠心法を組合せた場合は不成功であった。しかし、Sephacryl S-300 ゲル濾過法と Cellufine Sulfate カラム法の組合せにおいては、前者→後者では改善無しであったが、逆順の後者→前者では精製度が飛躍的に向上した。手順の前後が有効性に大きく影響する例の一つであろう。より詳細な条件検討を行えば有用な手法に確立可能と考えられる。

以上のように、本研究は計画通り或いは計画以上に進捗しているものと思われる。

E. 結論

DENV-VLP ワクチン抗原開発を前期官民共同研究から継続して推進し、以下の成果を得た。

- 1) DENV1~4 型ウイルス価を定量できる plaque/focus assay 法を確立した。
- 2) DENV1~4 型の prM/E 蛋白質を定量できる DENV 抗原 ELISA 法を単クローン抗体を組合せて樹立し、本法が感染性 DENV 粒子も感度良く検出できる事を見出した。
- 3) Cellufine Sulfate カラム法と Sephacryl S-300 ゲル濾過法の組合せで、効率良い VLP 抗原精製法の確立が示唆された。
- 4) 種々にデザインした DENV 中和 epitope domain を含む prM/E VLP 発現ベクターの一過性発現系で、以下の興味深い成績が得られた。
 - ① DENV prM-E の発現・分泌に他のシグナル配列が有効に作用する。
 - ② 分泌された DENV 抗原では E と prM が相互作用をしている。
 - ③ DENV E の膜貫通 domain は他の膜貫通 domain と置換可能である。
 - ④ DENV 中和 domain は他の prM-E ベクター系のバックグラウンド下でも発現可能である。

以上のように、計画通り/計画以上の進捗が得られ、且つ、学術的にも興味深い新知見が得られた。

F. 健康危険情報

該当事項なし。