

図1 ナトリウムチャネル模式図および抵抗性要因となるアミノ産置換

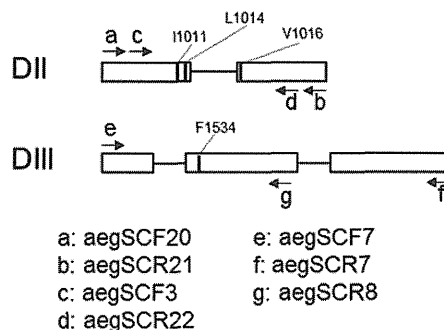


図2 ナトリウムチャネルジェノタイプングに用いたプライマー

表1 フィリピンで採集されたネツタイシマカのノックダウン(*kdr*)遺伝子頻度

Date	Collection site	Latitude	Longitude	aeg_k index	Frequency (%) of <i>kdr</i> allele (number of genes)			
					I1011M (or V)	L1014F	V1016G	F1534C
100120	1017	14.57325	120.99552	36	0 (40)	0 (40)	40.0 (40)	57.5 (40)
100120	1024	14.51071	121.0629	36	0 (40)	0 (40)	61.0 (40)	32.5 (40)
100121	1033	14.45359	120.95689	-	-	-	-	-
100121	1036	14.24265	120.97519	36	0 (40)	0 (40)	61.0 (38)	55.3 (38)
100121	1038	14.23437	120.97235	24	0 (40)	0 (40)	38.9 (36)	37.5 (40)
100121	1043	14.13224	120.95693	36	0 (40)	0 (40)	25.0 (40)	52.5 (40)
100121	1048	13.91293	120.87854	-	-	-	-	-
100122	1058	14.24651	121.49989	36	0 (40)	0 (40)	2.8 (36)	2.5 (40)
100122	1060	14.16936	121.52566	-	-	-	-	-
100122	1062	14.11035	121.56377	-	-	-	-	-
100122	1067	14.05383	121.33596	36	0 (22)	0 (22)	2.8 (22)	70.0 (20)
100123	1068	14.28674	121.45785	36	0 (10)	0 (10)	20.0 (10)	10.0 (10)
100123	1070	14.33553	121.48249	36	0 (40)	0 (40)	13.9 (36)	26.3 (40)
100123	1073	14.40488	121.47192	36	0 (34)	0 (34)	14.7 (34)	6.3 (34)
100124	1082	14.58024	121.01339	-	-	-	-	-
100124	1083	14.57339	121.03798	36	0 (40)	0 (40)	13.2 (38)	76.3 (40)
100125	1091	14.94609	120.91333	-	-	-	-	-
100125	1092	14.93375	120.87854	-	-	-	-	-
100125	1101	14.9582	120.94452	20	0 (34)	0 (34)	10.7 (28)	47.1 (34)
100126	1105	15.17369	120.58837	-	-	-	-	-
100126	1107	15.43991	120.5985	36	0 (38)	0 (38)	21.1 (38)	36.8 (38)
100127	1111	16.45699	120.58875	-	-	-	-	-
100127	1114	16.601	120.31829	36	0 (40)	0 (40)	6.7 (30)	62.5 (40)
100128	1117	17.92418	120.48009	36	0 (24)	0 (24)	27.3 (22)	20.8 (24)
100128	1120	18.57626	120.81693	36	0 (40)	0 (40)	0 (38)	45.0 (40)
100128	1121	18.56063	120.91668	-	-	-	-	-
100128	1122	18.56974	120.99013	18	0 (8)	0 (8)	25.0 (4)	0 (8)
100128	1123	18.60155	121.09129	25	0 (40)	0 (40)	17.5 (40)	32.5 (40)
100129	1132	16.94814	121.77198	15	0 (40)	0 (40)	7.5 (40)	31.6 (40)
100129	1133	16.69273	121.54966	36	0 (38)	0 (38)	28.9 (38)	61.1 (36)

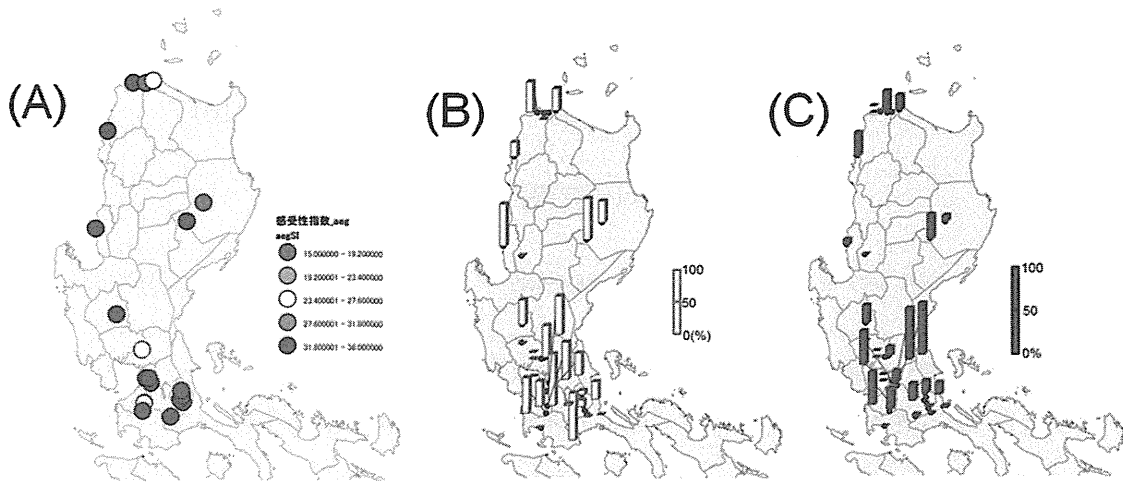


図3 フィリピン国内で採集されたネッタイシマカの薬剤感受性レベル(A)およびナトリウムチャンネルの V1016G 変異頻度(B), F1534C 変異頻度(C)のマッピング

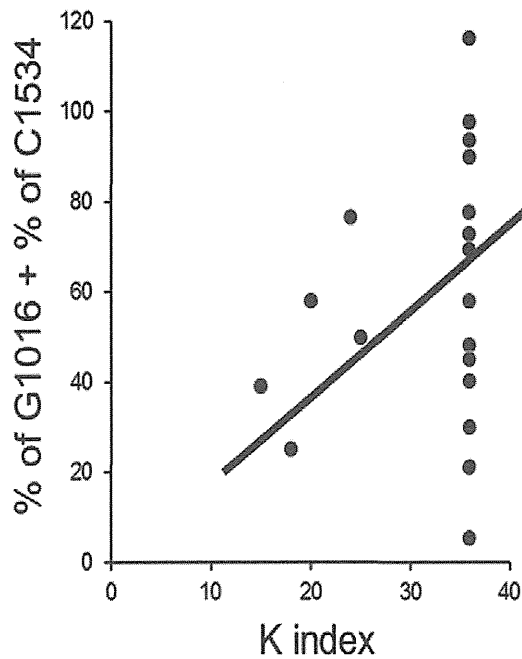


図4 抵抗性度合い(K index)と*kdr*遺伝子頻度の相関
*aeg_k index*とは、幼虫に対するd-アレスリンの0.1および0.4 ppm に対して得られた感受性スコアを掛け合わせた値を示す。感受性スコアは、半数個体がロックダウンするのに要した時間を数値化したもので、1, <5 min; 2, 5-10 min; 3, 10-15 min; 4, 15-20 min; 5, 20-30 min; and 6, >30 minで表した。

表2 ジェノタイピングに用いたプライマーの配列

Name	Primer sequence
<i>aeg</i> SCF20	<i>gacaatgtggatcgcttccc</i>
<i>aeg</i> SCR21	<i>gcaatctggttgtaacttg</i>
<i>aeg</i> SCF3	<i>gtggaactcaccgacttca</i>
<i>aeg</i> SCR22	<i>ttcacgaacttgagcgcgttg</i>
<i>aeg</i> SCF7	<i>gagaactcgccgatgaactt</i>
<i>aeg</i> SCR7	<i>gacgacgaaatcgaacaggt</i>
<i>aeg</i> SCR8	<i>tagctttcagcggcttcttc</i>

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

日本脳炎ウイルスレプリコンを用いた1回感染性フラビウイルス粒子の産生とその利用

研究分担者 小西 英二（大阪大学微生物病研究所教授）

研究協力者 鈴木 亮介（国立感染症研究所ウイルス第2部）

研究要旨 ウイルスのリバーシジェネティクス系を用いた1回感染性ウイルス粒子産生系は、ウイルス生活環の解明などの基礎研究に有用であるばかりでなく、より安全な次世代ワクチン開発への応用も期待されている。本研究ではCMVプロモーター下流に日本脳炎ウイルス(JEV)レプリコンcDNAを挿入したJEVレプリコンプラスミドを構築し、このプラスミドとJEV構造領域発現プラスミドを哺乳動物細胞にコトランスフェクションする事により、簡便な1回感染性JEV粒子の産生系を確立した。1回感染性JEV粒子はJEVと同様に抗JEV血清によりその感染が中和される事から、安全な感染中和アッセイに有用であると考えられた。本産生系の特徴は、JEV以外のフラビウイルスの構造蛋白質遺伝子を用いる事により、目的の表面ウイルス蛋白を有する粒子を比較的容易に設計できることにある。これにより、デングウイルス、ウエストナイルウイルス、黄熱ウイルス、ダニ媒介性脳炎ウイルスの1回感染性粒子の産生にも成功した。

A. 研究目的

日本脳炎ウイルス（JEV）はフラビウイルス科フラビウイルス属に分類され、蚊の媒介によりヒト等に脳炎を引き起こす原因ウイルスである。脳炎発症者の致死率は高く、また生残者の半数においても精神神経学的後遺症を残す重篤な疾患である。ウイルス粒子産生効率が高く容易にウイルス抗原が作製できるため、同じフラビウイルス属でありながら増殖力の低いデングウイルスのモデルとしても長く研究されてきた。これまでにウイルス構造領域遺伝子の一部を欠損させながらもウイルスのRNAゲノム複製機能を保持しているレプリコンと、

トランスに供給された構造蛋白質により、1回のみ細胞に感染する事が可能なウイルス粒子の作製がJEVを含む様々なフラビウイルスを用いて報告されているが、デングウイルスレプリコンの複製効率は一般的に高くはない。

本研究では、JEVのレプリコンをCMVプロモーター下流に挿入する事により、*in vitro*でのRNA合成が不要であり、直接プラスミドを哺乳動物細胞に導入する事により、JEVのRNAゲノムを細胞内で複製させる系を構築した。このプラスミドを利用する事により、迅速かつ簡便な1回感染性JEV粒子の産生系の確立を目指した。さらに、

デングウイルスを含む他のフラビウイルスの粒子表面蛋白をコードする遺伝子をプラスミドに組み込むことにより、当該の表面蛋白をもつウイルス粒子を作製できるように工夫した。

B. 研究方法

JEV Nakayama 株のレプリコン cDNA を CMV プロモーターと HDV リボザイム配列の間に挿入したレプリコンプラスミドを作製した (図 1)。また、このレプリコンから NS5 領域でフレームシフトさせ、RNA ポリメラーゼ活性を持たない変異体も作製した (図 1)。JEV の構造蛋白発現プラスミドは、JEV Nakayama 株由来の C-E、C、prME 領域それぞれの cDNA を CAG プロモーター下流に挿入して構築した (図 1)。ウイルス RNA の複製は、プラスミドを Huh7 細胞にトランスフェクションし、抗 dsRNA 抗体を用いた細胞染色により確認した。感染性ウイルス粒子の産生は、レプリコンプラスミドおよび構造領域発現プラスミドを 293T 細胞にトランスフェクションし、その培養上清を Vero 細胞に感染させ、2 日後に抗 NS1 抗体を用いた細胞染色を行う事により確認した。抗 JEV ウサギ血清による感染中和アッセイは、段階希釈した血清とウイルス液を室温で 1 時間インキュベーションした後に Vero 細胞に感染させ、2 日後に抗 NS1 抗体を用いて細胞染色を行い、染色された細胞数を計測することにより行った。JEV 以外の 1 回感染性フラビウイルス粒子の産生には、各フラビウイルスの prME 発現プラスミドを構築し、JEV レプリコンプラスミド、JEV C 発現プラスミドと一緒に 293T 細胞に導入した。

(倫理面への配慮)

本研究で使用するヒト由来の細胞は過去に樹立された株であり、倫理面での問題は無いと考えられる。その他のヒト材料は使用して

いない。また、動物実験は行っていない。

C. 研究結果

JEV レプリコンプラスミドを Huh7 細胞にトランスフェクションし、2 日後に細胞を固定し、抗 dsRNA 抗体を用いて細胞を染色すると、陽性細胞が認められた (図 2)。NS5 遺伝子中にフレームシフトを起こした変異体を導入した細胞では染色が認められなかった事から、レプリコンプラスミドをトランスフェクションした細胞内でウイルスゲノムの複製が起こっている事が示唆された。

次に、レプリコンプラスミドと C-E 発現プラスミドを 293T にトランスフェクションすると、3 日目の培養上清中に約 10⁶ IU/ml の感染性粒子が産生された (図 3)。C-E 発現プラスミドを、C 発現プラスミドおよび prME 発現プラスミドの 2 つプラスミドに分割して発現させた場合でも、同様の結果が得られた (図 3)。このようにして得られたウイルスを naive な Vero 細胞に感染させても、その感染細胞の培養上清中にはウイルス感染価が認められない事から、得られたウイルスは 1 回のみ感染性である事が確認できた。

抗 JEV ウサギ血清による 1 回感染性 JEV 粒子の感染中和は、血清の濃度依存的に認められ、またそのレベルは JEV Nakayama 株に対する活性と同程度であった。

デングウイルス、ウエストナイルウイルス、黄熱ウイルス、ダニ媒介性脳炎ウイルスの prME 発現プラスミドと JEV レプリコンプラスミド、JEV C 発現プラスミドを 293T にコトランスフェクションしたところ、デングウイルスでは感染価が低かったものの、試した全てのウイルスで 1 回感染性粒子の産生が認められた (図 4)。

D. 考察

JEV のレプリコン cDNA を CMV プロモーター下流に挿入する事により、*in vitro* で RNA 合成をする事なく、プラスミドを直接細胞に導入して JEV ゲノムを複製させる事が出来た。またこの時に構造領域発現プラスミドを同時にトランスフェクションすれば、1 回感染性のウイルス粒子が得られる事が明らかとなった。従って、構造領域に変異を導入したウイルスの作製を迅速、簡便に行える事が期待される。このレプリコンプラスミドを用いる手法は 1 回感染性ウイルスだけでなく、通常のウイルスのリバースジェネティクスとしても応用可能であると考えられる。

デングウイルスでは得られた 1 回感染性ウイルスの感染価が他のウイルスに比べて低く、特に 4 型デングウイルスでは、レプリコン側の適応変異の導入や、構造蛋白質発現細胞株の樹立を行う等の改善が必要であると思われた。レプリコンプラスミドに感度の良いレポーター遺伝子を導入する事も感度の上昇や感染を定量的に解析する為に役立つと思われる。

本研究により、迅速かつ簡便に様々な 1 回感染性フラビウイルス粒子の産生が可能となった。そのため、prME の塩基配列情報のみからウイルスの作製が可能になると考えられる。フラビウイルスの中でもデングウイルスは、抗体がウイルス感染の中和と感染増強の両者に働く事が知られている。ウイルスの E 蛋白の変異と抗体や血清による感染中和／感染増強の詳細な解析が今後必要である事から、本研究による 1 回感染性ウイルス粒子の産生方法がそれらのアッセイに有用であると期待される。

また、昨今の安全保障貿易管理や生物多様性条約に基づくアクセスおよび利益配分の関係で、ウイルスの国境を超える移動には制限があり、容易に他国で分離されたウイルスを入手することは困難となってきた。遺伝子情報取得のみで同一表面を持つウイ

ルス容易に作製できる本産生系により、国外流行株の解析が可能となり、国内侵入時の対策への貢献が期待される。

最後に、現在 JEV ワクチンとして不活化ワクチンが用いられているが、この不活化ワクチンの製造には感染性ウイルスを大量に培養、精製する過程が必須である。1 回感染性のウイルスを抗原として用いる事が出来れば、製造過程の安全性を高め、製造コストの削減が期待される。また構造蛋白質に変異が生じる可能性が少ない等の利点も考えられる。

E. 結論

プラスミドトランスフェクションによる 1 回感染性 JEV 粒子産生系を確立した。prME の配列を変える事によりデングウイルス、ウエストナイルウイルス、黄熱ウイルス、ダニ媒介性脳炎ウイルスの 1 回感染性粒子の迅速簡便な作製も可能であり、それらは感染中和アッセイ等に有用である。

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

Mulyatno KC, Yamanaka A, Yotopranoto S, Konishi E: Vertical transmission of dengue virus in *Aedes aegypti* collected in Surabaya, Indonesia, during 2008–2011. *Jpn J Infect Dis.* 65, 274-276, 2012

Yamanaka A, Tabuchi Y, Mulyatno KC, Susilowati H, Hendrianto E, Soegijanto S Konishi E: Dengue virus infection-enhancing and neutralizing antibody balance in children of the Philippines and Indonesia. *Microbes Infect.* 14:1152-9, 2012

Yamaji H, Segawa M, Nakamura M, Katsuda T, Kuwahara M, Konishi E: Production of Japanese encephalitis virus-like particles using the baculovirus-insect cell system. *J Biosci Bioeng.* 114:657-62, 2012

Konishi E, Kitai Y, Nishimura K, Harada S: Follow-up survey of Japanese encephalitis virus infection among humans in Kumamoto Prefecture, south-west Japan: status during 2009–2011. *Jpn J Infect Dis.* 65:448-50, 2012

Yamaji H, Nakamura M, Kuwahara M, Takahashi Y, Katsuda T, Konishi E: Efficient production of Japanese encephalitis virus-like particles by recombinant lepidopteran insect cells. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2012 Sep 5. [Epub ahead of print]

Sjatha F, Takizawa Y, Yamanaka A, Konishi E: Phylogenetic analysis of dengue virus types 1 and 3 isolated in Jakarta, Indonesia in 1988. *Infect Genet Evol.* 12:1938-43, 2012

Kuwahara M, Kitai Y, Kondo T, Konishi E: Survey of antibodies specific for West Nile virus in horses from 2006 to 2010 in Japan. *Jpn J Infect Dis.* 65:553-5, 2012

Suzuki R, Saito K, Kato T, Shirakura M, Akazawa D, Ishii K, Aizaki H, Kanegae Y, Matsuura Y, Saito I, Wakita T, Suzuki T. Trans-complemented hepatitis C virus particles as a versatile tool for study of virus assembly and infection. *Virology.* 432:29-38, 2012

Murayama A, Sugiyama N, Watashi K, Masaki T, Suzuki R, Aizaki H, Mizuochi T, Wakita T, Kato T. Japanese reference panel of blood specimens for evaluation of hepatitis C virus RNA and core antigen quantitative assays. *J Clin Microbiol.* 50:1943-9, 2012

Ando T, Imamura H, Suzuki R, Aizaki H, Watanabe T, Wakita T, Suzuki T. Visualization and measurement of ATP levels in living cells replicating hepatitis C virus genome RNA. *PLoS Pathog.* 8:e1002561, 2012

2. 学会発表

小瀧将裕、山口総平、花原景子、小西英二 : マウスモノクローナル抗体を用いたデング 1 型ウイルス E 抗原上の中和及び増強エピソードの解析。第 47 回日本脳炎ウイルス生態学研究会。2012 年 5 月。

Sjatha F, Konishi E : Chimeric Japanese encephalitis-dengue DNA vaccine as a strategy to reduce induction of dengue virus infection-enhancing antibodies in mice。第 47 回日本脳炎ウイルス生態学研究会。2012 年 5 月。

Atsushi Yamanaka, Kris C. Mulyatno, Helen Susilowati, Eryk Hendrianto, Siti Churrotin, Amor P. Ginting, Dian D. Sary, Fedik A. Rantam, Soegeng Soegijanto and Eiji Konishi: Molecular epidemiology of dengue and chikungunya viruses in Surabaya, Indonesia 2008-2012. The 46th Joint Working Conference on Viral Diseases, The Japan-United States Cooperative Medical Science Program, 2012 年 6 月。

山中敦史、小西英二：インドネシア及びタイで分離されたデングウイルスの分子疫学解析。第 53 回日本熱帯医学会。2012 年 9 月。

山中敦史, Thongrungrat S, Ramasoota P, 小西英二：Cell Fusing Agent Virus のタイ国における分離と分子系統樹解析。第 19 回トガ・フラビ・ペスチウイルス研究会。2012 年 11 月。

小西英二：デングワクチンの開発と抗体依存性感染増強への対策。第 60 回日本ウイルス学会学術集会。2012 年 11 月。

Sjatha F, Kuwahara M, Sudiro TM, Konishi E: Dengue virus envelope protein domain III substitution on Japanese encephalitis DNA vaccine reduced induction of infection-enhancing antibodies in vaccinated mice. 第 60 回日本ウイルス学会学術集会。2012 年 11 月。

Sudiro TM, Yunita R, Putri DH, Antonjaya U, Sjatha F, Dewi BE, Rukmana A, Mustaqim, Sudarmono P, Konishi E: Immunogenicity of DNA Vaccine Containing Premembrane & Envelope Genes of Dengue Virus Type 2 Indonesian Isolate. 第 60 回日本ウイルス学会学術集会。2012 年 11 月。

小瀧将裕、小西英二：デング 1 型ウイルス E 抗原エピトープの解析：感染中和及び増強活性のみを示すマウスモノクローナル抗体を用いたアプローチ。第 60 回日本ウイルス学会学術集会。2012 年 11 月。

山中敦史、小西英二：タイ国のネッタインマカから分離された Cell Fusing Agent

Virus の分子進化解析。第 60 回日本ウイルス学会学術集会。2012 年 11 月。

小西英二、小瀧将裕、山中敦史：デングワクチンによる感染増強抗体誘導の懸念と最小化の戦略。第 16 回日本ワクチン学会学術集会。2012 年 11 月。

Soegijanto S, Sari DW, Yamanaka A, Kotaki T, Kameoka M, Konishi E: Awareness of using Ringer's Lactate Solution in Dengue Virus Infection can Induce Severity. Asian-African Research Forum on Emerging and Reemerging Infections (AARF) 2013. 2013 年 1 月。

Morita K, Konishi E, Kurosu T, Minagawa N: Consortium Study: Inter-regional Study on Dengue Virus and Vector Mosquitoes. Asian-African Research Forum on Emerging and Reemerging Infections (AARF) 2013. 2013 年 1 月。

Mulyatno KC, Churrotin S, Nindya I, Yamanaka A, Kotaki T, Kameoka M, Soegijanto S, Konishi E: Phylogenetic and Molecular Clock Analysis of Dengue Virus Strains Isolated in Surabaya and Sidoarjo, Indonesia, during 2011-2012. Asian-African Research Forum on Emerging and Reemerging Infections (AARF) 2013. 2013 年 1 月。

Yotopranoto S, Mulyatno KC, Yamanaka A, Konishi E: Distribution of Aedes mosquito Immatures in Multiple Types Indoor and Outdoor Water-holding Containers in Dengue-endemic Districts in Surabaya, Indonesia, 2011-2012. Asian-African Research Forum on

Emerging and Reemerging Infections (AARF) 2013. 2013年1月。

Suzuki R, Matsuda M, Watashi K, Aizaki H, Matsuura Y, Wakita T, Suzuki T. Identification of the signal peptidase complex subunit 1 as a novel host factor that participates in the assembly of hepatitis C virus. The 11th Awaji international forum on infection and immunity. Awaji, Japan. 2012. 9. 11-14.

Matsumoto Y, Watanabe N, Watashi K, Suzuki R, Matsuura T, Suzuki T, Miyamura T, Ichinose S, Wake K, Wakita T, Aizaki H. Antiviral activity of glycyrrhizin against Hepatitis C virus in vitro. The 11th Awaji international forum on infection and immunity. Awaji, Japan. 2012. 9. 11-14.

Uchida N, Saeed M, Suzuki R, Aizaki H, Wakita T. Characterization of anti-HCV release inhibitors targeting phospholipase D. 19th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Venice, Italy 2012.10.5-9.

Matsumoto Y, Watanabe N, Watashi K, Suzuki R, Matsuura T, Suzuki T, Miyamura T, Wake K, Wakita T, Aizaki H. Antiviral activity of glycyrrhizin against Hepatitis C virus in vitro. 19th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Venice, Italy 2012.10.5-9.

Uchida N, Watashi K, Suzuki R, Aizaki H, Chiba J, Wakita T. Phospholipase D regulates membrane trafficking during

Hepatitis C virus egress. 19th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Venice, Italy 2012.10.5-9.

Suzuki R, Matsuda M, Watashi K, Aizaki H, Matsuura Y, Suzuki T, Wakita T. An alternative endocytosis pathway for the productive entry of Hepatitis C virus. 19th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Venice, Italy 2012.10.5-9.

Ito M, Suzuki R, Wakita T, Suzuki T. Permissivity of HuH-7-derived oval-like cells to HCV infection and replication. 19th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Venice, Italy 2012.10.5-9.

Suzuki R, Matsuda M, Watashi K, Aizaki H, Matsuura Y, Wakita T, Suzuki T. Identification of a host factor that interacts with hepatitis C virus NS2 protein and participates in the assembly of the virus through an interaction with E2 and NS2. The 34th Infection,immunity and their control for health: Mucosal barrier, pathogen and vaccine. Sapporo, Japan. 2012. 10. 16-19.

Aly HH, Suzuki R, Oshiumi H, Wakita T, Seya T. Overcoming host restriction barriers for HCV infection in mouse. The 34th Infection,immunity and their control for health: Mucosal barrier, pathogen and vaccine. Sapporo, Japan. 2012. 10. 16-19.

伊藤昌彦、鈴木亮介、福原崇介、松浦善治、脇田隆字、鈴木哲朗。HuH-7由来オーバル

様細胞における HCV 感受性の解析. 日本ウイルス学会第 60 回学術集会, 大阪, 2012 年 11 月 13-15 日.

渡士幸一、内田奈々子、大東卓史、清原知子、鈴木亮介、相崎英樹、脇田隆字. IL-1 および TNF- α の B 型肝炎ウイルス感染阻害効果. 日本ウイルス学会第 60 回学術集会, 大阪, 2012 年 11 月 13-15 日.

松田麻未、鈴木亮介、渡士幸一、相崎英樹、松浦善治、鈴木哲朗、脇田隆字. C 型肝炎ウイルスの一過性感染性粒子を用いた細胞内侵入機構の解析. 日本ウイルス学会第 60 回学術集会, 大阪, 2012 年 11 月 13-15 日.

松本喜弘、渡邊則幸、渡士幸一、鈴木亮介、松浦知和、鈴木哲朗、宮村達男、和氣健二郎、脇田隆字、相崎英樹. グリチルリチンの C 型肝炎ウイルスに対する抗ウイルス作用の解析. 日本ウイルス学会第 60 回学術集会, 大阪, 2012 年 11 月 13-15 日.

Suzuki R, Matsuda M, Watashi K, Aizaki H, Matsuura Y, Miyamura T, Wakita T, Suzuki T. Identification of a host factor that interacts with hepatitis C virus NS2 protein and participates in the viral assembly. The 10th JSH Single Topic Conference “Hepatitis C: Best Practice Based on Science”. Tokyo, Japan. 2012.11. 21-22.

Matsuda M, Suzuki R, Watashi K, Aizaki H, Matsuura Y, Miyamura T, Suzuki T, Wakita T. An alternative endocytosis pathway for the infectious entry of Hepatitis C virus. The 10th JSH Single Topic Conference “Hepatitis C: Best Practice Based on Science”. Tokyo, Japan. 2012.11. 21-22.

Ito M, Suzuki R, Wakita T, Suzuki T. Epigenetic reprogramming of HuH-7 cells shift cellular permissivity to HCV. The 10th JSH Single Topic Conference “Hepatitis C: Best Practice Based on Science”. Tokyo, Japan. 2012.11. 21-22.

Watashi K, Uchida N, Suzuki R, Aizaki H, Wakita T. Phospholipase D is a cellular regulator during Hepatitis C virus egress and a possible target for antiviral strategy. The 10th JSH Single Topic Conference “Hepatitis C: Best Practice Based on Science”. Tokyo, Japan. 2012.11. 21-22.

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

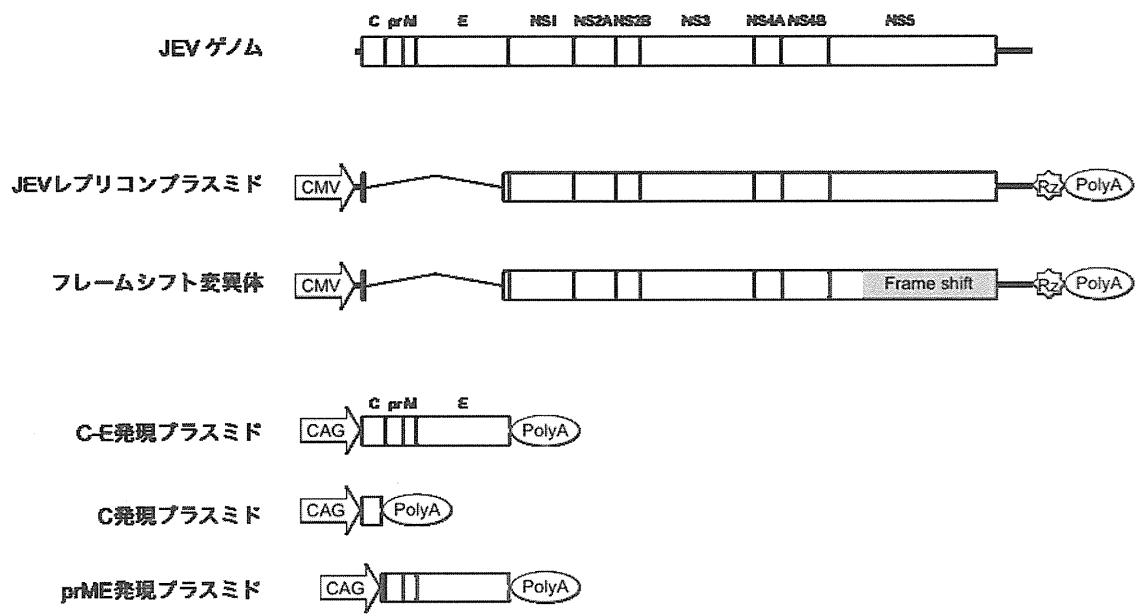


図1. JEVレプリコンプラスミドおよび構造領域発現プラスミド。

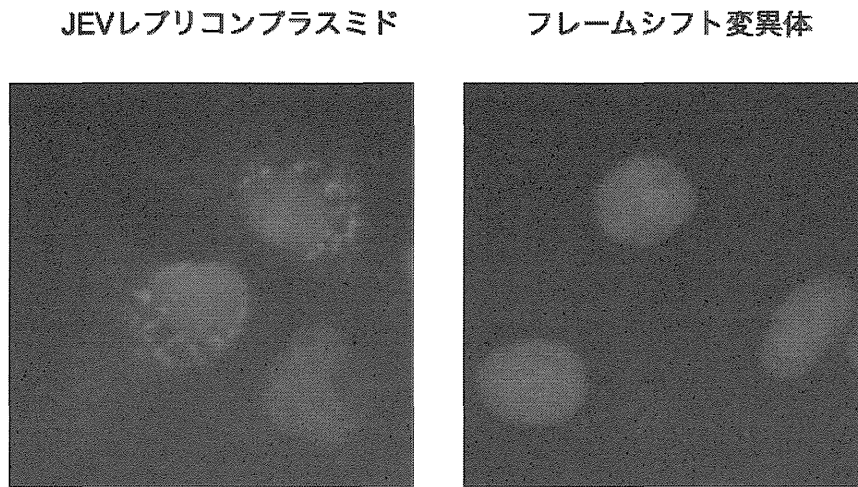


図2. JEVレプリコンプラスミド導入細胞におけるウイルスRNAの複製。Huh7細胞にプラスミドを導入し、2日後に細胞を固定し、抗dsRNA抗体およびDAPIで染色した。

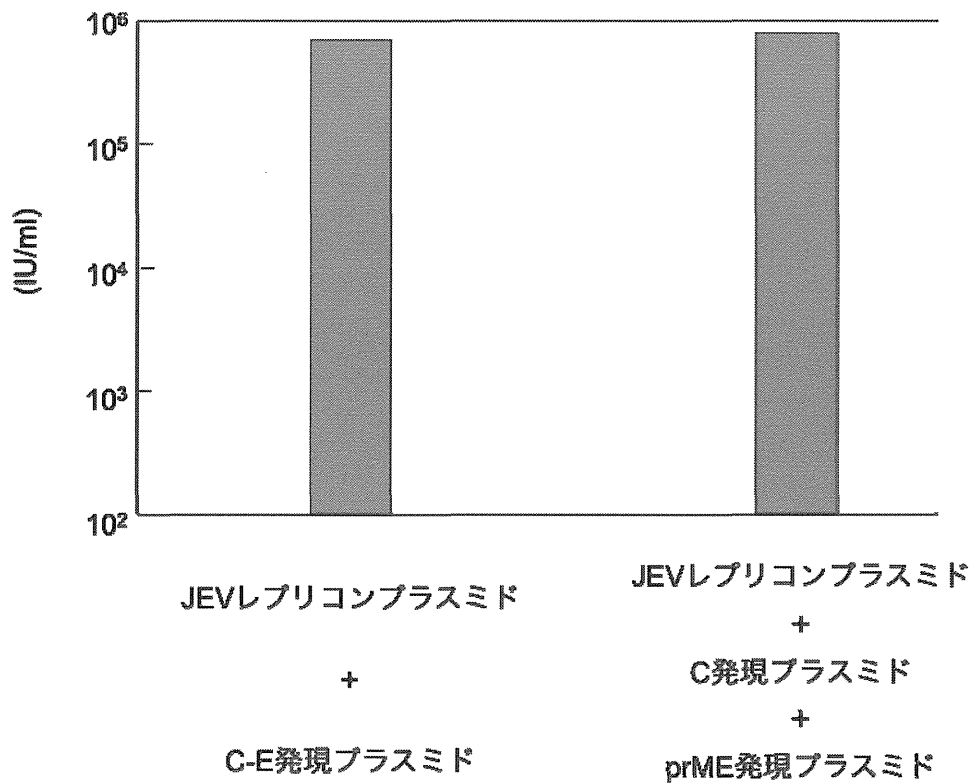


図3. JEVレプリコンプラスミドおよび構造領域発現プラスミドを293T細胞にトランスフェクションした細胞の、3日目の培養上清の感染価。

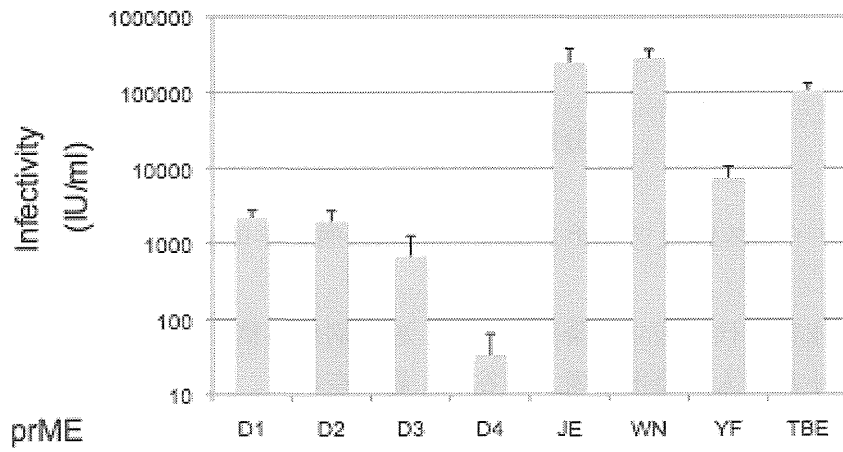


図4. JEVレプリコンプラスミド、JEG Cプラスミド、および様々なフラビウス prME発現プラスミドを293T細胞にトランスフェクションした細胞の、3日目の培養上清の感染価。

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

デングウイルス新規ワクチン開発のための病理学的評価系の確立

研究分担者：永田典代（国立感染症研究所 感染病理部第二室長）

研究協力者：小島朝人、鈴木忠樹、小谷治、岩田奈織子、長谷川秀樹

（国立感染症研究所 感染病理部）

研究要旨：本研究では、デングウイルス様粒子を用いたワクチン開発を目標として、感染動物実験系とその病理学的評価系の確立を目的としている。今年度は、分与された4つの血清型のデングウイルスをVero細胞に継代、馴化を行い、新生仔マウスにおける病原性を確認した。一方で、感染培養細胞およびマウス組織を用いて参照標本作製し、ホルマリン固定およびパラフィン包埋標本におけるウイルス特異的モノクローナル抗体の交差反応性と至適条件の検討を行い、組織切片上のウイルス抗原検出系を確立した。

A. 研究目的

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。そのため、ワクチン施策にはDENV1～4型に対する4価ワクチンが必須であると考えられており、現在のところ有効なワクチンは未だ無い。

我々は日本脳炎ウイルス様粒子(JE-VLP)、ウエストナイルウイルス様粒子(WNV-VLP)を利用したワクチン開発に携わってきた。そこで本研究では、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)の開発を目標としている。昨年度すでに、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。今年度は分与された4つの血清型のデングウイルスをVeroE6細胞に継代、馴化を行い、このウイルスの新生仔マウスにおける病原性の確認を行った。一方で、感染培養細胞およびマウス組織を用いて参照標本作製し、ホルマリン固定およびパラフィン包埋標本におけるウイルス特異的モノクローナル抗体の交差反応性と至適条件の検討を行い、組織切片上のウイルス抗原検出系を確立した。本報告書では、マウス感染実験を中心に報告する。

B. 研究方法

使用ウイルスと細胞

いずれも高崎智彦博士より分与いただいた。

- DENV 1 型: NIID10-07 標準株 (D1/Hu/Philippines)
- DENV 2 型: NIID20110116 株 (D2/Hu/INDIA09-74)
- DENV 3 型: Den 3, 00-27/1 株 (C6#1, Vero9013#1. 08 Decem, 2003)
- DENV 4 型: NIID 08-11 標準株 (D4/Hu/Solomon)

これらを VeroE6 細胞で継代し、培養上清で 10^5 PFU/ml 以上を回収できるように馴化した。

感染動物実験

生後 1 日以内の ddY マウス (SLC より購入) に対し、VeroE6 細胞で 4 継代目のウイルス感染細胞上清をそれぞれマイクロシリンジで $10 \mu\text{l}$ 、右側視床内に脳内接種した。対照群には細胞培養液 MEM $10 \mu\text{l}$ を同様に接種した。

接種後 25 日まで体重測定、臨床症状の観察を行い、病原性発現の有無を検討した。また、接種 3, 7, 25 日目に 3 または 4 匹ずつ過麻酔殺後に解剖を行い、ホルマリン灌流固定パラフィン包埋組織標本を作製した。なお、臨床症状の発現を確認し哺乳困難と判断した個体は、過麻酔殺し病理標本を作製した。なお、本動物実験は、国立感染症研究所の動物実験委員会に承認された実験計画に従って実施した。

病理学および免疫組織学的検索

10%ホルマリン緩衝液灌流および浸漬固定後の DENV1-4 型感染マウス組織材料 (脳、脊髄、心、肺、腎、肝、脾) を用いて、常法どおりパラフィン包埋切片を作製した。脱パラフィン後、一部はヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色を実施した。また、ウイルス抗原を検出するために、一次抗体として

Anti-Dengue Virus E glycoprotein antibody [8] (ab80914) を用いて免疫組織化学染色を実施した。脱パラフィンした切片を抗原賦活化剤 (pH6.0) (ニチレイ) 中で 121°C 10 分オートクレーブ処理によって抗原賦活化し、過酸化水素水・メタノール (室温 30 分) による内因性ペルオキシダーゼの阻止を行った。その後は、ヒストファイน์ マウスキット [マウス組織用マウス第一抗体] (ニチレイ) を用い、プロトコールに従い免疫染色を行い、ウイルス抗原を検出した。なお、1 次抗体は 2000 倍希釈し、 4°C で一晩インキュベートした。

C. 結果

デングウイルス分与株の VeroE6 細胞と新生仔マウスにおける増殖性と病原性を表にまとめた。

DENV3 型は VeroE6 細胞で増殖性が比較的、悪く、他の血清型に比べると高いウイルス価は得られなかったが、結局、4 継代目にはすべての血清型で (凍結融解することなしに) 細胞上清に 10^5 PFU/ml 以上のウイルス価が得られた。

DENV1-4 型感染 VeroE6 細胞上清をそれぞれ $10 \mu\text{l}$ 用いて生後 1 日以内の新生仔 ddY マウスに脳内接種したところ、いずれのウイルスもマウスに対して種々の病原性を発揮した。接種後の体重変化を図 1 左に示した。

DENV1 および 2 型接種マウスは感染 8-10 日目に音などの外部刺激に対して過敏反応を示し、突然走り出す、跳ねるなどの神経症状を示した (表)。いずれもその後、哺乳困難、瀕死となったため病理解剖を行った。その結果、海馬、皮質、視床、延髄等の神経・グリア細胞にウイルス抗原陽性細胞が認められ (接種 7 日目)、これに伴う神経細胞の脱落、壊死、炎症性反応がみられた (瀕死期) (図 2A-D)。

DENV3型接種マウスは感染14日前後から外部刺激に対する過敏反応を示し一定期間体重増加が対照群に比べて緩徐となったが、これは一過性で25日目には回復した(図1右)。25日目の脳組織において、巣状壊死、血管を中心とした炎症所見が見られた(図2E)。病変部の変性細胞にウイルス抗原が検出された(25日目)。

DENV4型接種マウスは13匹の新生仔マウスに脳内接種を行ったが、6匹が接種翌日に死亡しており、残りの7匹も瀕死であった。これを病理解剖したところ、いずれの個体においても脈絡叢の血管は拡大し、血管内には血栓様の構造が見られた(図2F)。ただし、この病変は脳に限局しており、肺・肝・腎などの微小血管内で同様の所見は得られなかった。

D. 考察

デングウイルス分離株のVeroE6細胞とマウスにおける増殖性・病原性について検討したところ、今回用いたDENV3型分離株はやや増殖性に劣った。今後の解析の必要に応じて、他の分離株で同様の検討を行い、比較的増殖性のよい株を選択する。また、今回使用したDENV4型NIID 08-11標準株は、新生仔マウスに非常に強い毒力を示したが、ウイルスが増殖した結果による病原性ではないと考えられるため、死因について更なる検討が必要である。組織所見から、接種後に局所に限局した急激な血液凝固反応あるいはショックを引き起こしたと考えられる。DENV4型についても他の分離株で同様の検討が必要である。DENV1と2型分離株は新生仔マウスの神経細胞、グリア細胞で増殖が可能で、ほぼ同様の病原性を発揮することが病理学的に示された。ただし、DENV2型分離株の方が、血管を中心とした炎症性反応が強い傾向が見られた。この血管病変についても着目する必要がある。

ある。

今後、これらのウイルスを用いて系統・齢の異なるマウスを用いた感染実験を行い、ワクチン攻撃実験に必要な動物実験系を確立していく予定である。

E. 結論

DENV1-4型分離株を使用して、新生仔マウスにおける病原性を明らかにした。一方で、VeroE6細胞、マウス組織を使用したホルマリン固定パラフィン包埋参照標本作製し、ウイルス抗原検出系を確立した。

F. 研究発表

1. 論文発表
なし

2. 学会発表

永田典代、岩田奈織子、早坂大輔、佐藤由子、小島朝人、佐多徹太郎、長谷川秀樹：BALB/cマウスを用いた脳炎関連フラビウイルスの病原性の比較。第60回日本ウイルス学会(大阪)2012年11月。

G. 知的財産の出願・登録状況

なし

表 デングウイルス分与株の VeroE6 細胞と新生仔マウスにおける増殖性と病原性

血清型	ウイルス株名	VeroE6 細胞		新生仔 ddY マウス 脳内接種			
		継代数	上清の 感染価 pfu/ml	マウスの症状	発症日	病原性 (25 日間)	組織病変/ウイルス 抗原陽性細胞
1 型	NIID10-07 標準株 (D1/Hu/Philippines)	4	1.4×10^6	神経症状 (外部刺激 過敏、哺乳困難)	9 日	有、致死的	壊死、炎症 /神経・グリア細胞
2 型	NIID20110116 株 (D2/Hu/INDIA09-74)	4	1.7×10^6	神経症状 (外部刺激過敏、瀕死)	8 日	有、致死的	壊死、炎症 /神経・グリア細胞
3 型	Den3,00-27/1(C6#1, Vero9013#1. 08Decem, 2003)	4	1.6×10^5	神経症状 (外部刺激 過敏、一過性)	14 日	有、生残	巣状壊死、血管炎 /病変部変性細胞
4 型	NIID 08-11 標準株 (D4/Hu/Solomon)	4	8.8×10^5	突然死、不動	1 日以内	有、致死的	鬱血、血栓 /陰性

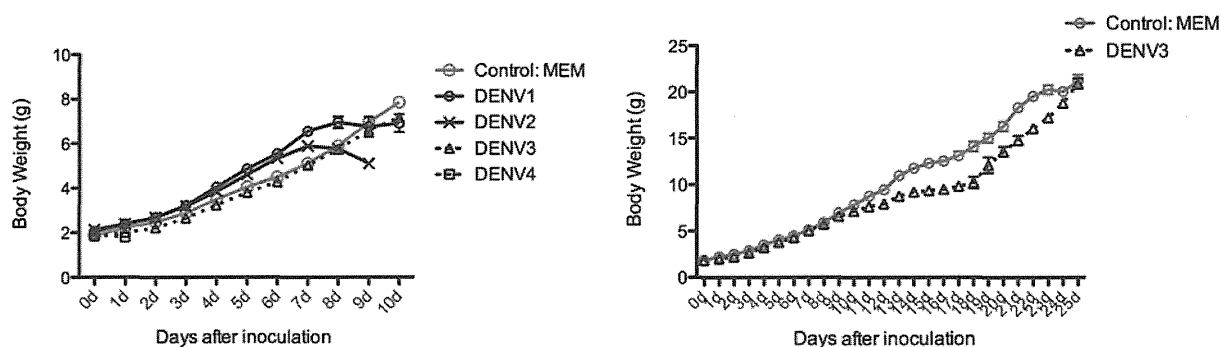


図 1 デングウイルス脳内接種後の新生仔マウスの体重変化

左 デングウイルス 1-4 型および細胞培養液接種後(Control: MEM)の体重変化。デングウイルス 1 型および 2 型接種マウスは接種 8 日目に外部刺激過敏などの神経症状を示し哺乳困難になったので 10 日以内にすべて解剖した。デングウイルス 4 型接種マウスは接種 1 日目に半数が死亡し、残りの個体もすべて瀕死となったので、解剖に供した。デングウイルス 3 型接種マウスは接種 10 日以内に明らかな症状は示さなかった。

右 デングウイルス 3 型と細胞培養液接種後(Control: MEM)の体重変化。デングウイルス 3 型接種マウスは接種 2 週間目には明らかに、外部刺激に過敏な反応を示し、20 日目には尾をつかんで持ち上げると振戦症状を示した。しかし、25 日間の臨床症観察期間では致死的ではなく、症状の改善がみられた。

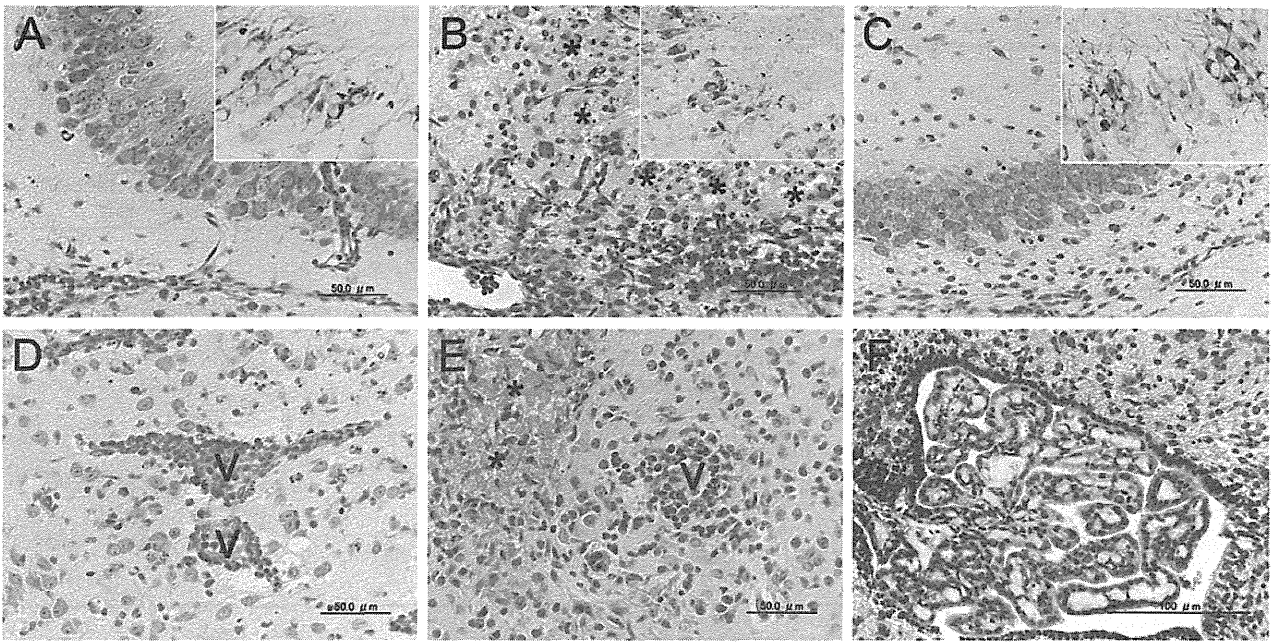


図2 デングウイルス脳内接種後の新生仔マウスの脳組織の変化

A-F、ヘマトキシリン・エオジン染色。A-C 挿入図、免疫組織化学法によるウイルス抗原の検出。デングウイルス1型接種後7日目の海馬に軽度の炎症性細胞浸潤がみられ (A)、神経層にウイルス抗原が陽性である (A 挿入図)。10日目の海馬の神経細胞は脱落し (B*)、強い炎症性反応が認められる。残存する変性細胞はウイルス抗原陽性である (B 挿入図)。デングウイルス2型接種後7日目の海馬神経層ではウイルス抗原陽性細胞がみられ (C 挿入図)、10日目の視床において強い血管内外の炎症性細胞浸潤が見られた (D)。デングウイルス3型接種25日目の視床に巣状壊死 (E*) と血管周囲の細胞浸潤がみられる (V、血管)。デングウイルス4型接種1日目の第四脳室の脈絡叢の血管は拡張し、血管内には微小血栓が存在した (F)。

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

「GENECUBE を用いたアルボウイルスの迅速診断法の開発、および健常成人における細胞培養日本脳炎ワクチンに対する抗体応答の持続効果」

研究分担者 高橋 和郎 (大阪府立公衆衛生研究所 副所長兼感染症部長)

研究協力者 青山 幾子、弓指 孝博、加瀬 哲男

(大阪府立公衆衛生研究所 感染症部ウイルス課)

研究要旨:

1. GENECUBE®を用いたアルボウイルスの迅速診断法の開発

GENECUBE 法によりDV, JEV は比較的高感度で検出可能であり、臨床検査への応用が可能と考えられた。WNV に対しては低感度であり今後の検討課題である。

2. 健常成人における細胞培養日本脳炎ワクチンに対する抗体応答の持続効果

成人において日本脳炎ワクチン接種により88%の成人は有意な抗体上昇を認めたが、1年後にはその21%が陰転化した。特に、ワクチン接種前の中和抗体価が<10である群の陰転化率は37.5%と高値であった。さらに、ワクチン接種後10倍という低い中和抗体価しか獲得できなかった群(高齢者が多数を占める)では90%の人が陰性化した。以上より50歳代以上では2回接種を受けるほうが望ましいと考えられた。

A. 研究目的

[GENECUBE を用いたアルボウイルスの迅速診断法の開発]

現在、地方衛生研究所では、アルボウイルスの遺伝子診断について、患者検体および蚊やカラス検体を対象にPCR法と塩基配列の決定により確定診断を行っている。しかし、蚊の検体数は多く、検査には3-5日を要する。今般、遺伝子検査を30分で判定可能な自動核酸検出装置を使用し、迅速で高感度な検出方法の開発を目的とした。この実験診断法が確立すると、地方衛生研究所では、より効率的で高性能な診断法が導入でき、

より迅速な感染症対策に寄与できることが期待される。

[健常成人における細胞培養日本脳炎ワクチンに対する抗体応答の持続効果]

本邦で使用されている日本脳炎ワクチンは不活化ワクチンであるため、抗体価は接種後5~10年で低下するといわれている。厚生労働省感染症流行予測調査の結果では、40~50代の抗体保有率が低く、近年発生する日本脳炎患者の3~4割はこの年代である。また、2009年から新しい乾

乾燥細胞培養日本脳炎ワクチンが定期接種に使用されているが、成人における使用例は少なく、その効果に関する情報は少ない。今回我々は、成人における新規日本脳炎ワクチンの抗体応答とその持続性について検討した。

B. 研究方法

[GENECUBE を用いたアルボウイルスの迅速診断法の開発]

1. 対象ウイルスとPCR法の設計

対象ウイルスはデングウイルス(DV)1-4型、ウエストナイルウイルス(WNV)、日本脳炎ウイルス(JEV)である。DVのプライマーとプローブはウイルス遺伝子の3'端近傍に位置し、4種の型に共通する配列を選定した。WNVとJEVについては、プライマーはこれらに共通する配列を選定し、プローブは1塩基異なる配列の部位を選定した。

2. PCR反応と検出感度の検討

既知の力価のウイルスからRNAを抽出し、逆転写酵素でcDNAを作製してKODポリメラーゼによりPCR反応を行い、プローブと反応することにより特異性が検証される。検出感度は抽出したRNAを、また上記PCR産物DNAを段階希釈することにより検討した。

[健常成人における細胞培養日本脳炎ワクチンに対する抗体応答の持続効果]

1) 対象

本研究に同意を得た一般健常人 272 名 年齢: 20~72 歳(中央値 43 歳)に乾燥細胞培養日本脳炎ワクチン(阪大微研 ジェービック V®)を接種し、ワクチン接種前と、接種約1ヶ月後に採血を実施し、ワクチン接種により抗体が陽転した対象者のうち 154 名について接種 1 年後に再度採血を実施した。

2) 中和抗体価測定

日本脳炎ウイルス(JEV) Beijing-1 株に対する中和抗体価を 50%フォーカス減少法(FRNT₅₀)を用いて測定した。このとき、血清希釈 10 倍以上で中和活性を示した血清を中和抗体陽性とした。幾何

平均抗体価は、中和抗体価 10 倍未満を 0.5 とし算出した。

なお、本研究は大阪府立公衆衛生研究所の倫理審査委員会で承認を受けており、検体提供者へはインフォームドコンセント及び検体の匿名化など倫理面への配慮がなされている。

C. 研究結果

[GENECUBE を用いたアルボウイルスの迅速診断法の開発]

1. ウイルス遺伝子の検出と検出感度の検討

DVは1-4型すべて検出可能であった。検出感度は4型が 10 コピー、3 型が 100 コピーで、1,2 型は今後精査し行う予定である。最少検出ウイルス力価は1型 2.3×10^{-2} PFU, 2 型 6.0×10^{-4} PFU, 3型 3.2×10^{-3} PFU, 4型 2.3×10^{-2} PFUであった。

JEV Beijing-1 株に対する検出限界は、 1.0×10^{-2} PFUであった。

WNV NY株に対する検出限界は、NY株のPCR産物をテンプレートとした場合 10^4 コピーと非常に低感度であった。

[健常成人における細胞培養日本脳炎ワクチンに対する抗体応答の持続効果]

1. ワクチン接種前後の JEV に対する中和抗体価

日本脳炎ワクチン接種者 272 名のうち、104 名はワクチン接種前より JEV に対する中和抗体を保有していた(表 1)。接種前の抗体保有率は厚生労働省流行予測調査の結果と同様の傾向を示し、50 代で一番低くなった。1 回のワクチン接種により JEV 中和抗体価が 2 倍以上上昇したのは 239 名(88%)で、JEV に対する幾何平均抗体価は接種前 2.7 倍、接種後 50.4 倍と約 19 倍の有意な上昇が認められた。ワクチン接種前より抗体を保有していた 104 名は、接種により全員 2 倍以上抗体価が上昇した。

2. ワクチンにより誘導された抗体価の持続性について

ワクチン接種者 272 名のうち継続調査ができた 154 名の幾何平均抗体価は、ワクチン接種 1

ヶ月後 87.6 倍から 1 年後には 21.8 倍と約 1/4 に低下した (表 2)。1 年後の陰転率は 21.4% (31/154) で、ワクチン接種後の抗体価が低いほど陰転化する割合は上昇した。接種後 160 倍以上の対象者では陰転化した例は認められなかった。

継続調査が可能であった 154 名中、ワクチン接種前の中和抗体価が <10 で抗体陽転した 80 名の群では、1 年後 <10 に陰転化した例は 30 例 (37.5%) であり、1 年後に陰転化した 31 例の 96.7% を占めた。また、この群の中和抗体の平均半減期 ($t_{1/2}$) は 5.1 か月であった。一方、ワクチン接種前の中和抗体価が ≥ 10 ワクチン接種前の中和抗体価が ≥ 10 で抗体上昇した 64 名の群では、1 年後 <10 に陰転化した例は 1 例 (1.6%) であった。この例はワクチン接種前抗体価 10 倍で、接種後抗体価 20 倍と低抗体価の例であった。また、この群の中和抗体の平均半減期 ($t_{1/2}$) は 7.8 か月であった。

D. 考察

[GENECUBE を用いたアルボウイルスの迅速診断法の開発]

1. GENECUBE 法による DV に対する検出感度は 10-100 コピー (DV3,4 型) であり、ウイルス力価として 1 型 2.3×10^{-2} PFU, 2 型 6.0×10^{-4} PFU であった。また、JEV Beijing-1 株に対する検出限界は、 1.0×10^{-2} PFU であったことから、これらウイルスに対する検出限界は コピー数としては 10-100 コピー程度と推定されるので、遜色ない感度と考えられる。
2. WNV に対しては低感度であり、使用した WNV NY99 株のプライマーとプローブの塩基配列に変異があることも推定されるので、今後の検討課題である。

[健康成人における細胞培養日本脳炎ワクチンに対する抗体応答の持続効果]

今回使用したワクチンは成人でも 100% のブースター効果がみられ、有効性が確かめられ

た。また、陽転率は 80.4% となり、成人に対する接種も有効であることが確認できた。陽転率は年齢とともに低下することから、年齢により免疫応答能が低下していることが示唆された。また 60 代以上では低年齢でのワクチン接種歴がない場合が多く、初期免疫がないために抗体価が上昇しにくい可能性が考えられた。本研究において、ワクチン 1 回および 2 回接種後の総陽転率は 93.8% であり、初回 2 回接種後の小児の陽転率が 99.2% (添付文書記載) であることと比較すると、成人での陽転率は十分高いと考えられる。ただし、一回の接種で抗体価が 10 倍以下で上昇しない場合が 1 割ほどあることが想定され、50 代以上では 2 回接種が望ましいと考えられた。

ワクチン接種後に中和抗体価が 2 倍以上上昇した群において、接種 1 年後に抗体価は約 1/4 に低下した。特に、ワクチン接種によって抗体価が 10 倍にしか上昇しない場合、1 年後の陰転率は 90% であり、1 年以内にほぼ消失した。また、ワクチン接種前の中和抗体価が <10 で抗体陽転した 80 名の群では、1 年後 <10 に陰転化した例は 30 例 (37.5%) と高率であり、この群の中和抗体の平均半減期 ($t_{1/2}$) は 5.1 か月と、ワクチン接種前の中和抗体価が ≥ 10 であった群の平均半減期 ($t_{1/2}$) 7.8 か月と比較すると有意に短く、早期に減少する。この理由として、ワクチン接種前の中和抗体価が <10 である群は、幼少児期でのワクチン接種歴がないかあるいは少数回の接種歴しかない可能性が高いと考えられ、免疫記憶の程度が低いと考えられる。従って、抗体応答能も低く、1 年後の抗体価の減少がより顕著であったと推定される。

E. 結論

[GENECUBE を用いたアルボウイルスの迅速診断法の開発]

1. GENECUBE 法により DV, JEV は比較的高感度で検出可能であり、臨床検査への応用が可能と考えられる。WNV に対しては低感度であり今後