

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（H23-25 年度）

チクングニア熱を予防する DNA ワクチンの試作及び
キメラ Dengue 1 型ウイルス様粒子の作製と診断用抗原としての評価

研究分担者 小西 英二（国立大学法人大阪大学・タイ国マヒドン大学）

研究協力者 鈴木 亮介（国立感染症研究所）

山中 敦史（国立大学法人大阪大学・タイ国マヒドン大学）

研究要旨 蚊媒介性ウイルス疾患には国際感染症が多く含まれ、その中で Dengue 熱やチクングニア熱はわが国の輸入感染症例数が近年増加している。しかし、治療薬やワクチンは無い。本研究班における初年度（平成 23 年度）は、チクングニア熱を予防する DNA ワクチンの試作を行った。2 年目（平成 24 年度）は、日本脳炎ウイルスレプリコンプラスミドを作製して 1 回感染性のウイルス様粒子（SRIP）産生系を確立し、他のフラビウイルスの表面蛋白を有するキメラ SRIP も作製できることを示した。最終年度（平成 25 年度）は、Dengue 1 型ウイルス（DENV-1）の表面蛋白を有するキメラウイルス様粒子が、本来の DENV-1 の代替抗原として中和試験及び感染増強試験に使用可能であることを示した。ウイルスの国境を超える移動の制限は大きいと、国外のウイルスが遺伝子情報のみで国内で容易に作製できる技術は有用であり、ワクチンの評価や診断系の開発、また国民のリスクアセスメントや病原性の解明などへの利用が期待される。

A. 研究目的

チクングニア熱（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。Dengue 熱（DF）は、発熱、発疹、頭痛、眼窩痛、筋肉痛、関節痛等を呈する一過性熱性疾患であるが、重症の Dengue 出血熱（DHF）は、Dengue 熱の症状に加えて血漿漏出や出血傾向、さらにショック症状を示して致命的となる。現在のところ、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。

これらの疾患は熱帯・亜熱帯地域に流行するが、わが国では流行国への渡航者による輸入感染症が問題となる。そして近年、輸入感染症例数は増加している。しかも輸入感染症にとどまらず、国内流行の可能性も危惧される。これらの病気を媒介するヒトスジシマカは東北以南に生息するため、輸入感染症として帰国したウイルス血症の患者をヒトスジシマカが吸血することで、蚊にウイルスが伝播する可能性がある。ウイルス保有蚊が生じると、その刺咬によりヒトが感染を受けていわゆる国内伝播が発生する。温帯地域における国内伝播の事例

はヨーロッパの国々で報告されており、わが国でも国内伝播を示唆するDF患者発生が最近報告された。

これらの疾患に対する総合的対策の確立を目的として、初年度(平成23年度)には、CHIKVを予防するDNAワクチンを試作した。2年目(平成24年度)には、日本脳炎ウイルス(JEV)レプリコンプラスミドを作製して1回感染性のウイルス様粒子(SRIP)産生系を確立した。さらに、他のフラビウイルスの表面蛋白を有するキメラSRIPも作製できることを示した。最終年度(平成25年度)には、デング1型ウイルス(DENV-1)の表面蛋白を有するキメラウイルス様粒子(D1-SRIP)が、中和試験及び感染増強試験に使用可能であることを示した。

B. 研究方法

CHIKV ゲノム RNA : BaH306 株 (AY424803)、SL10571 株 (AB455494)、S27 株 (AF369024) のゲノム 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。

JEV レプリコンプラスミドの作製 : JEV 中山株のレプリコン cDNA を、CMV プロモーターと HDV リボザイム配列の間に挿入して JEV レプリコンプラスミドを作製した。pCMV-JErep は、JEV ゲノムからカプシド (C) 領域の大部分、全長の前駆膜 (prM) そして E 領域の大部分を除いた遺伝子がレプリコンとして細胞内で複製されるように設計した。一方 pCMV-JErep-fullC は、JEV ゲノムにおける全長の C 領域は保存し、全長の prM と大部分の E 領域のみを除いたレプリコンが機能するように設計された。

JEV または DENV-1 の構造蛋白質発現プラスミド : JEV 中山株あるいは DENV-1 望月株の C-E、C、prM/E 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。

SRIP の感染力価測定法 : レプリコンプラスミドおよび構造蛋白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 あるいは K562 細胞に感染させ、2 日後に抗 JEV-NS1 抗体を用いた細胞染色により計数した。

中和試験 : 段階希釈した抗体と抗原 (JEV、DENV-1、JEV-SRIP、D1-SRIP) を混合し、室温で 1 時間あるいは 37°C で 2 時間保温後に 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、プラークまたは感染細胞を計数した。抗体を含まない陰性対照で得られた平均値からの減少率を % で表し、50% プラーク (または感染細胞) 数減少を示す希釈度 (PRNT50) を中和抗体価とした。

増強試験 : 段階希釈した抗体と抗原 (DENV-1 または D1-SRIP) を混合し、37°C で 2 時間保温した後に、準接着系 K562 細胞を加えた。2 日後に抗 NS1 抗体を用いた細胞染色を行いプラークまたは感染細胞を計数した。実験群で得られたプラーク・感染細胞数を、抗体を含まない陰性対照のプラーク・感染細胞数が 100 になるように換算した。また、これらの活性は補体レベルに依存することがあるため、補体を含む系と含まない系で行った。

(倫理面への配慮)

本研究におけるヒト血清の使用および動物実験は、当該研究機関の倫理委員会及び動物実験委員会により承認された。

C. 研究結果

CHIKV DNA ワクチンの試作及び評価 : BaH306 株、SL10571 株、S27 株のウイルスゲノム RNA から RT-PCR を行い、E1 - E3、6K 遺伝子を pcDNA3 ベクターに組込んだ。これらのプラスミドを CHO 細胞へ導入し、免疫染色により細胞内 CHIKV 抗原の発現が確認された。

JEV レプリコンプラスミドの評価：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。この結果は、ウイルス RNA が細胞内で複製され、レプリコンとして機能したことを示す。

JEV-SRIP 放出の確認：JEV レプリコンプラスミドと JEV の 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 10^6 IU/ml の感染性粒子が産生された。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。この結果は、プラスミドのコトランスフェクションにより細胞から感染性粒子が放出されたことを示す。また、このようにして得られたウイルスを 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ことから、得られたウイルスは 1 回のみでの感染性である事が確認できた。

JEV 抗体による JEV-SRIP の中和：抗 JEV ウサギ血清による JEV-SRIP 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 中山株に対する活性と同程度であった。この結果は、JEV-SRIP の表面抗原構造が、本来の JEV のそれと同様であることを示す。

他のフラビウイルスの表面抗原を持つ SRIP の作製：DENV、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 prM/E 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 細胞にコトランスフェクションしたところ、DENV 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。

D1-SRIP 収量を増加させる工夫：pCMV-JErep-fullC を用いて作製された

D1-SRIP の放出量を継時的に測定したところ、トランスフェクション後 3 日目ではほぼ最高値に達した。この値 (10^4 IU/ml) は、pCMV-JErep を用いて得られた感染力価 (10^3 IU/ml) より約 10 倍高値であった。この結果は、全長の C 領域遺伝子をレプリコンプラスミドに組み込む工夫により、SRIP の収量が上昇したことを示す。

D1-SRIP 抗原の増強試験における評価：D1-SRIP と Dengue 抗体陽性ヒト血清を用いて、増強試験を行なった。得られた抗体濃度依存的反応曲線は、本来の DENV-1 抗原を用いて得られた曲線と類似した。さらに希釈度 $1:10^1 \sim 1:10^6$ で得られた感染細胞数を、DENV-1 抗原と D1-VLP 抗原の間で比較したところ、補体存在下でも非存在下でも、高い有意の相関を示した (相関係数は 0.95 以上 : $P < 0.001$)。

次に、抗 DENV-1 モノクローナル抗体を用いて増強試験を行ったところ、血清で得られた結果と同様に DENV-1 抗原と D1-VLP 抗原の間で類似の抗体濃度依存的反応曲線が確認された。希釈度 $1:10^1 \sim 1:10^5$ で得られた感染細胞数も、補体存在下と非存在下の両条件において、DENV-1 抗原と D1-VLP 抗原の間で高い有意の相関を示した (相関係数は 0.98 以上 : $P < 0.001$)。

D1-SRIP 抗原の中和試験における評価：Vero 細胞を用いた従来の中和試験でも同様の比較を行った。増強試験の結果と同様に、DENV-1 抗原と D1-VLP 抗原を用いて得られた抗体濃度依存的反応曲線に大きな差異は見られなかった。さらに、PRNT50 を求めたところ、両抗原で得られた値に有意の相関が認められた (相関係数は 0.919 : $P < 0.001$)。

D. 考察

「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」が重視される昨今、国境を超えるウイルスの

運搬には制限があり、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。一方で、多くの海外渡航者が現地で流行しているウイルスを輸入感染症として国内に持ち込む可能性も増大しているため、診断用抗原として海外のウイルスを用いる必要性も生じる。そこで、遺伝子情報取得のみで同一表面を持つウイルスを容易に作製できる系の確立は、大きな意義を持つ。

本研究班における2年目と3年目の研究において、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。

フラビウイルス粒子表面蛋白の合成に関わるprM/E遺伝子の発現により、ニュークレオカプシドが存在しない空の粒子が細胞から放出される。この粒子はELISA等の抗体結合試験の抗原として使用可能であることが、JEV等の比較的産生量の高いウイルスでは示されている。しかし、DENVでは抗原として使用できるほどの収量が通常は得られない。一方、prM/E遺伝子の導入と同時にレプリコンプラスミドを導入すると、RNAを含むニュークレオカプシドが存在するSRIPが放出される。感染性があるため、抗原としての感度が上がり、また中和試験や増強試験等の抗体機能試験に使用可能となる。本研究の評価により、D1-SRIPはデング抗体機能試験において、ウイルスの代替抗原として使用できることが示された。

2012年に報告された世界初のデングワクチン効力評価では、中和抗体が検出されているにもかかわらず低い効力がデング2型ウイルスで示され、従来の測定法で求められた中和抗体価では必ずしも防御の指標とはならず、中和試験を改良する必要性が示唆された。中和活性と増強活性のバランスを測定する方法は、その解決策の1つである。本研究のSRIP作製系により様々な血清型・遺伝子型のウイルス抗原の作製が可能となり、これらを用いて抗体の機能試験を行うことは、将来のワクチン開発や発症機序の解明、さらに国外流行株の国内侵入時の対策に貢献することが期待される。

E. 結論

CHIKVの3株を用いて試作したDNAワクチンは、いずれも細胞内にCHIKV抗原を発現することを確認した。また、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。prM/Eの配列を変える事により他のフラビウイルスとのキメラ粒子も作製できた。キメラデング1型ウイルス様粒子は、本来のウイルスの代替抗原として、デング抗体機能試験に使用可能であることが示された。

F. 健康危険情報

特記すべき事項なし。

G. 研究発表

研究成果の刊行に関する一覧表に記載した。

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし