

新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業  
委託業務成果報告

(委託業務題目)

国内侵入・流行が危惧される昆虫媒介性ウイルス感染症に対する総合的対策に関する研究

担当責任者研究報告書

フラビウイルス抗体測定に有用な 1 回感染性ウイルス様粒子の開発と応用

担当責任者 小西 英二 (国立大学法人大阪大学・微生物病研究所；タイ国マヒドン大学・熱帯医学部)

研究協力者 モイ・メンリン (国立感染症研究所・ウイルス第一部)

高崎智彦 (国立感染症研究所・ウイルス第一部)

倉根一郎 (国立感染症研究所・ウイルス第一部)

鈴木 亮介 (国立感染症研究所・ウイルス第二部)

山中 敦史 (国立大学法人大阪大学・微生物病研究所；  
タイ国マヒドン大学・熱帯医学部)

**研究要旨** 昆虫媒介性ウイルスは世界に分布する病原体である。我が国には少数種しか存在しないが、昨年のデング熱のように外国から侵入し流行を起こす可能性がある。流行を抑えるためには、診断法や予防ワクチンの開発などの幅広い対策が求められる。しかし、開発に必要となるウイルスの国境を超える入手は困難になりつつある。我々は一昨年度の本研究班において、ウイルスの遺伝子情報のみで 1 回感染性ウイルス様粒子 (SRIP) を作出する方法を確立した。昨年度は、デング 1 型ウイルス (DENV-1) の遺伝子情報から作製した D1-SRIP が、DENV-1 の代替抗原として、中和試験等の抗体機能試験に使用可能であることを示した。本年度は、昨年度から輸入症例の散見されるジカウイルスの SRIP 作製に成功した。この結果は、新規診断法の開発に SRIP 技術が有用であることを示す。また、DENV-1 の遺伝子型 I あるいは IV に感染した輸入症例の血清は、各遺伝子型の DENV-1 株から作製した 5 種の D1-SRIP に対して、ほぼ同じ中和抗体価を示すことを明らかにした。この結果は、デングウイルスの遺伝子型による比較的大きな抗原性の違いが指摘される中、DENV-1 ワクチンに関しては 1 種の遺伝子型ですべての遺伝子型をカバーできることを示唆する。

**A. 研究目的**

昆虫媒介性ウイルス感染症には脳炎等ヒトに重篤な症状を引き起こすものが多い。また、世界における分布域も広い。我が国

の昆虫媒介性ウイルス感染症は限られるが、海外への旅行者や外国から渡航する旅行者の数は増加し、ヒトやモノの移動による国内へのウイルス侵入の可能性も同時に高く

なってきた。昨年にはデングウイルスが国内伝播を起こし、160人以上が感染した。今後、デングウイルスに限らず、国外の昆虫媒介性ウイルスの我が国への侵入が懸念される。すでに診断法や予防ワクチンが確立されているものは少数の昆虫媒介性ウイルス感染症に対するものであり、流行を未然に防ぐあるいは小規模に止めるためには、これら国外で流行する感染症に対する診断法やワクチンの開発など、幅広い対策が求められる。

診断については、患者の遺伝子学的検査や抗体検査による確定診断が重要である。中和試験は、最も特異性の高い抗体検査法として広く用いられてきた。したがって、中和試験の抗原となる国外のウイルスが必要である。一方、ワクチン開発のためには、誘導された抗体が種々の地域に流行中のウイルスに対して有効かどうかについて評価する際などに、国外のウイルス株を入手する必要がある。しかし、「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」が重視されてきたため、国境を超えるウイルスの運搬は困難となってきた。したがって、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は有用である。

我々は一昨年度の本研究班において、中和試験等の抗体機能検査用の抗原を、ウイルスの遺伝子情報のみで作出できる方法を確立した。これは、日本脳炎ウイルス(JEV)レプリコンプラスミドと、JEVの表面蛋白の合成に関わる前駆膜蛋白(prM)及びエンベロープ蛋白(E)遺伝子を発現するプラスミドを哺乳類細胞に共導入することにより、1回感染性のウイルス様粒子(SRIP)を産生させる方法である。利点は、他のフラビウイルスの表面蛋白を発現するプラスミドとの共導入により、キメラSRIPが得られることにある。昨年度は、デング1型ウイルス(DENV-1)の遺伝子情報から作製し

たD1-SRIPが、DENV-1の代替抗原として抗体機能試験に使用可能であることを示した。このことは、遺伝子情報に基づく表面蛋白を有するキメラSRIPが形成されたことを意味し、入手できない外国株でもその塩基配列から、同一の表面を持つウイルスが国内で使用できることにつながる。

本年度は、SRIP技術の診断法確立への応用として、ジカウイルス(ZIKV)の遺伝子情報からSRIP(ZIKV-SRIP)作製を試みた。また、ワクチン開発への応用として、DENV-1の遺伝子型による抗原性の違いを検討した。ZIKVは、アジア、アフリカやオセアニアに分布し、このウイルスが引き起こすジカ熱の輸入症例が最近認められるようになってきた。一方、デングウイルスはデング熱(DF)やデング出血熱(DHF)を引き起こし、世界の熱帯・亜熱帯地域に分布する。わが国では輸入感染症として1999年から報告され、2009年まで概ね年間100例までの患者が発生してきたが、その数は増加傾向にあり、2010年、2012年及び2013年には200例以上が報告された。そのような中、2014年には国内伝播症例が発生し、輸入感染症例と合わせて、その数は300名以上に達した。

## B. 研究方法

**ZIKV-SRIPの作製**：国内輸入症例から分離されたZIKV(MR766-NIID株：GenBank LC002320)の表面蛋白遺伝子を哺乳動物細胞発現ベクターpcDNA3に組み込み、表面蛋白発現プラスミドpcZIKMEを作製した。JEVレプリコンプラスミドとして、JEV(中山株)ゲノムから大部分のprM/E遺伝子を除いたpCMV-JErep-fullCを用いた(図1A)。pcZIKMEとレプリコンプラスミドを293T細胞にコトランスフェクトし、3日目の培養上清に含まれるZIKV-SRIPをVero細胞及びK562細胞に対する感染性で評価した。ただし、K562

細胞を用いた評価では、低濃度のフラビウイルス交差性モノクローナル抗体 4G2 を感染前に加える系も用いた。また、pcZIKME をトランスフェクトした 293T 細胞を 4G2 抗体で免疫染色することにより、ZIKVprM/E 遺伝子の発現を調べた。

**D1-SRIP の作製**：GenBank に登録されている DENV-1 表面蛋白遺伝子の塩基配列情報から合成された DNA を pcDNA3 に組み込み、表面蛋白発現プラスミドを 5 種類の遺伝子型 (GI-GV) について作製した (表 1)。pCMV-JErep-fullC と共に 293T 細胞にコトランスフェクトし、3~7 日目の培養上清に含まれる D1-SRIP を感染力価測定後に、抗体試験用抗原として用いた。

**SRIP の感染力価測定法**：96 穴プレートに段階希釈した SRIP を含む培養上清を用意して、Vero 細胞および準接着系 K562 細胞の浮遊液を加えた。3 日後に接着した細胞層を固定し、抗 NS1 抗体を用いた免疫染色を行い、感染細胞を計数して感染力価を求めた。ミリリットルあたりの感染単位 (IU/ml) として表した。

**ヒト血清**：2004-2012 年に採取・保存されたデング輸入症例血清を急性期・回復期のペアで合計 44 検体を用いた (表 2)。

**増強抗体試験**：96 穴プレート中で段階希釈した検体と各遺伝子型の D1-SRIP 抗原を混合し、37°C で 2 時間保温した後に、準接着系 K562 細胞を加えた。3 日後に抗 NS1 抗体を用いた免疫染色を行い感染細胞を計数した。実験群で得られた感染細胞数を、抗体を含まない陰性対照の感染細胞数が 100 になるように換算した。

**中和抗体試験**：96 穴プレート中で段階希釈した検体と各遺伝子型の D1-SRIP 抗原を混合し、4°C で一夜保温した後に、24 穴プレートの Vero 細胞に感染させた。3 日後に抗 JEV-NS1 抗体を用いた免疫染色を行い、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、75%減少を示す希釈度を中和抗体価とした。

#### (倫理面への配慮)

ヒト血清の使用には、国立感染症研究所及び実験実施場所であるタイ国マヒドン大学熱帯医学部の倫理委員会から承認を受けた。

### C. 研究結果

**ZIKV-SRIP の収量**：pcZIKME が ZIKV 抗原を発現するかを予備的に調べるために、293T 細胞にトランスフェクトした後、4G2 抗体で免疫染色した。図 1B に示すように、抗原の発現が確認できた。次に、pCMV-JErep-fullC と pcZIKME を 293T 細胞にコトランスフェクトすることにより放出された ZIKV-SRIP の量を 3 日後に測定した。測定に用いた Vero 細胞の染色像を図 1C に、感染価 (産生量) を図 1D に示す。Vero 細胞を用いたとき、また 4G2 抗体を加えない系で K562 細胞を用いたときは、 $10^2$  オーダーの低い値であったが、4G2 抗体を加えた系では  $10^4$  オーダーにまで上昇した。この結果から、放出感染性粒子数は  $10^4$  を超えると考えられる。

**デング輸入症例急性期血清を用いた初感染の確認**：ヒトにおける DENV-1 の各遺伝子型に対する抗体応答を比較解析するためには、1 つの遺伝子型の DENV-1 に感染したヒト血清を用いる必要がある。今回対象とした血清は、ELISA により測定された IgG 値と IgM 値、及びその比率から初感染と判定されたものであるが、さらに中和試験によりすべての血清型に対して中和抗体価が 1:10 未満であることを確認した。

**DENV-1 各遺伝子型に対する中和抗体価の比較**：DENV-1 に感染した輸入症例の血清と各遺伝子型の DENV-1 株から作製した 5 種の D1-SRIP を用いて、中和抗体価を比較した。個体差を標準化するために GI 感染者であれば、GI 抗原に対する中和抗体価を 1

として、他の遺伝子型抗原に対する中和抗体価を相対値で表した(図2)。感染した遺伝子型が塩基配列から判定された患者と渡航国から推定された患者とで差が見られなかったため、まとめて図に表した。GI感染者及びGI感染推定者においても、GIV感染者及びGIV感染推定者においても、他の遺伝子型抗原に対する中和抗体価の平均値は、感染した遺伝子型に対する中和抗体価の平均値と2倍以上の差は認められなかった。この結果は、DENV-1のGIあるいはGIVに感染したヒトは5種の遺伝子型に対して、ほぼ同じレベルの中和抗体を誘導することを示す。しかし、GIIに対する中和抗体価には、GI感染者においてもGIV感染者においても比較的大きな個体差が示された。

**DENV-1各遺伝子型に対する増強抗体活性の比較:** 中和抗体の誘導が不十分な場合、感染増強が起こる可能性が指摘されている。そこで、各遺伝子型のDENV-1株から作製した5種のD1-SRIPに対する感染増強活性を調べた。感染増強活性は、2種の指標で解析した。1つは感染増強率であり、2倍階段希釈血清で示された感染細胞数を血清無添加対照で示された感染細胞数に対する増加として対数で表し、その最高値とした(一般的にFold enhancementと呼ばれる値)。他の1つは、感染増強抗体価であり、血清希釈度依存性曲線で表される増強活性が対照で得られた平均値+3×標準偏差値を下回らない最高血清希釈度とした。

感染増強率及び感染増強抗体価共に、他の遺伝子型抗原に対して得られた平均値は、感染した遺伝子型に対して得られた平均値と同等の値であった。この結果は、DENV-1のGIあるいはGIVに感染したヒトは5種の遺伝子型に対して、ほぼ同じレベルの感染増強抗体を誘導することを示す。しかし大きな個体差が認められ、GIV感染者においては感染増強率及び感染増強抗体価共に、GIまたはGV抗原に対して最大10倍以上の

差を示す個体が存在した。

#### D. 考察

フラビウイルス 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が、同時にレプリコンプラスミド (pCMV-JErep-fullC) を導入すると、細胞内で RNA を含むニュークレオカプシドが形成されて粒子形成の際に取り込まれるため、SRIP が放出される。すでに JEV の他、ウエストナイルウイルス、黄熱ウイルス、ダニ脳炎ウイルス及びデングウイルスの prM/E 遺伝子を用いて SRIP が放出されることを証明してきたが、今回 ZIKV の prM/E 遺伝子によっても SRIP が放出されることを示した。今後、中和試験に使用可能かを評価する必要がある。

SRIP 技術により、prM/E 領域の遺伝子情報に基づき、他国のウイルスと同様の抗原性を有する粒子を作製することは理論的に可能である。DENV-1 は 5 種類の遺伝子型に分類される、今回 GenBank に登録されている塩基配列から SPIR を作製し、中和試験及び増強試験の抗原として使用した。SRIP 抗原の作製は比較的容易であり、情報に基づき DENV の prM/E 発現プラスミドを作製し、pCMV-JErep-fullC と共に細胞にコトランスフェクションすることで得られる。この技術により世界中に分布する DENV 抗原の作製が可能となり、抗体解析やワクチン開発に貢献すると考えられる。

本研究では、DENV-1 に感染したヒトに誘導される抗体が、どの程度遺伝子型に依存しているかを SRIP 抗原を用いて調べた。マウスモデルにおいては、比較的大きな抗原性の違いが同一の血清型の中で証明されている。一方、現在開発中の種々戦略によるデング 4 価ワクチンには、各血清型で様々な遺伝子型が代表として使用されている。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、予想外に効力が低か

ったが、1つの理由としてワクチン株と流行株との抗原ミスマッチが指摘されたため、ヒトの抗体誘導における遺伝子型の影響を調べる意義は大きい。

これまでヒトにおいて遺伝子型のインパクトが調べられてこなかった理由として、単一の遺伝子型・血清型のみで感染したヒトを、デング流行国では容易に見つけられないことが挙げられる。複数の遺伝子型・血清型に感染したヒトに誘導された抗体では、正しい解析が困難である。そこで、本研究では我が国の輸入症例を対象とした。非流行国における輸入症例では初回感染が多く、従って単一の遺伝子型のみにより誘導された抗体の解析が可能となる。ペア血清を用い、急性期血清ですべての血清型に対する中和抗体が陰性であることを確認したのちに、回復期血清中の各遺伝子型に対する抗体レベルを比較した。

その結果、DENV-1の遺伝子型IあるいはIVに感染した輸入症例の血清は、各遺伝子型のDENV-1株から作製した5種のD1-SRIPに対して、ほぼ同等の中和抗体価を示すことが示された。このことは、DENV-1ワクチンに関しては1種の遺伝子型ですべての遺伝子型をカバーできることを示唆する。マウスにおける比較的大きな抗原性の違いは、E蛋白分子を構成する3つのドメインのうち、抗原特異性の高いドメインIIIに対する中和抗体をマウスが多く誘導することに基づくと考えられる。一方、ヒトに誘導される中和抗体はドメインIII以外に対するものであり、交差性抗体が多いとされる。

今後、他の血清型についても遺伝子型の影響を調べる予定である。SRIP作製系により多様な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

SRIP技術により、ZIKVの1回感染性粒子が作製できた。各遺伝子型のDENV-1抗原を作製し、GI/GIV感染がヒトに誘導した抗体は他の遺伝子型に対しても同等のレベルで中和することを示した。

## 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. Runtuwene LR, Konishi E, Yamanaka A, Makino Y, Suzuki Y, Takasaki T, Kurane I, Kobayashi T, Eshita Y. Dengue transmission model by means of viremic adult immuno-competent mouse. *Parasit Vectors*. 7(1):143, 2014.
2. Tomohiro Ishikawa, Atsushi Yamanaka and Eiji Konishi: A review of successful flavivirus vaccines and the problems with those flaviviruses for which vaccines are not yet available. *Vaccine*. 32(12):1326-37, 2014.
3. Tomohiro Kotaki, Atsushi Yamanaka, Kris Cahyo Mulyatno, Amaliah Labiqah, Teguh Hari Sucipto, Siti Churrotin, Soegeng Soegijanto, Eiji Konishi, Masanori Kameoka: Phylogenetic Analysis of Dengue Virus Type 3 Strains Primarily Isolated in 2013 from Surabaya, Indonesia. *Jpn J Infect Dis*. 67(3), 227-229, 2014.
4. Yamanaka A, Suzuki R, Konishi E. Evaluation of single-round infectious, chimeric dengue type 1 virus as an antigen for dengue functional

- antibody assays. *Vaccine*. 32(34):4289-95, 2014.
5. Tomohiro Ishikawa and Eiji Konishi: Japanese encephalitis: epidemiology, prevention, and current status of antiviral drug development. *Expert Opinion on Orphan Drugs* 2(9), 1-14, 2014.
  6. Kotaki T, Yamanaka A, Mulyatno KC, Churrotin S, Labiqah A, Sucipto TH, Soegijanto S, Kameoka M, Konishi E. Continuous dengue type 1 virus genotype shifts followed by co-circulation, clade shifts and subsequent disappearance in Surabaya, Indonesia, 2008-2013. *Infect Genet Evol.* 28C:48-54, 2014.
  7. 山中敦史、小西英二: デングワクチン。最新医学『グローバル感染症』69巻、4号、819-823頁、2014.
- ## 2. 学会発表
1. Ryohei Saga, Akira Fujimoto, Noriyuki Watanabe, Mami Matsuda, Ryosuke Suzuki, Makoto Hasegawa, Koichi Watashi, Hideki Aizaki, Noriko Nakamura, Eiji Konishi, Takanobu Kato, Haruko Takeyama, Takaji Wakita: Japanese encephalitis virus-subviral particles harboring HCV neutralization epitopes induce neutralizing antibodies against HCV. 21st International Symposium on Hepatitis C and Related Viruses. Banff Canada, September 7-11, 2014.
  2. Atsushi Yamanaka and Eiji Konishi: Dengue type 1 virus monoclonal antibody cocktails for analyzing neutralizing and enhancing antibody responses in human sera. 8th Vaccine & ISV Congress, Philadelphia, PA, USA, October 27, 2014
  3. 山中敦史、小西英二: デング 1 型ウイルスに対するマウスモノクローナル抗体を用いたヒト中和・増強抗体の解析。第 55 回日本熱帯医学会。2014 年 11 月 2 日。
  4. 小瀧将裕, Siti Churrotin, Nur Laila Fitriati Ahwanah, Soegeng Soegijanto, 小西英二, Orapim Puiprom, 岡林環樹, 生田和良, 亀岡正典: インドネシアのデング患者血を用いた抗デングウイルスヒト型モノクローナル抗体の樹立。第 21 回トガ・フラビ・ペスチウイルス研究会。2014 年 11 月 9 日。
  5. 正木秀幸、小澤龍彦、高崎智彦、青山幾子、弓指孝博、小西英二、岸 裕幸、村口 篤: I S A A C 法による日本脳炎ワクチン被接種者末梢血単核球からのヒト抗ウエストナイルウイルス中和モノクローナル抗体の樹立。第 21 回トガ・フラビ・ペスチウイルス研究会。2014 年 11 月 9 日。
  6. 嵯峨涼平、藤本陽、渡邊則幸、松田麻未、長谷川慎、渡士幸一、相崎英樹、中村紀子、小西英二、加藤孝宣、竹山春子、脇田隆宇、鈴木亮介: 日本脳炎ウイルスおよび C 型肝炎ウイルス 2 価ワクチン抗原の発現と中和抗体の誘導。第 62 回日本ウイルス学会学術集会。2014 年 11 月 12 日。
  7. 山中敦史、モイメンリン、高崎智彦、倉根一郎、鈴木亮介、小西英二: デング 1 型ウイルスの遺伝子型がヒトにお

ける中和・増強抗体応答に及ぼす影響。  
第 62 回日本ウイルス学会学術集会。  
2014 年 11 月 12 日。

8. Atsushi Yamanaka, Duangjai Oddgun, Nantarat Chantawat, Tamaki Okabayashi, Pongrama Ramasoota, Siti Churrotin, Tomohiro Kotaki, Masanori Kameoka, Soegeng Soegijanto, Eiji Konishi: Dengue virus infection-neutralizing and enhancing antibody responses in

central Thai populations against Indonesian and Thai strains. Joint International Tropical Medicine Meeting (JITMM 2014) and the 8th Seminar on Food- and Water-borne Parasitic Zoonoses (FBPZ8), Bangkok Thailand December 2, 2014.

H. 知的財産権の出願・登録状況  
なし

表 1. SRIP 作製に用いた各遺伝子型の DENV-1 株

遺伝子型	株名	GenBank*	分離年	分離国
GI	ThD1_0102_01	AY732479	2001	タイ
GII	16007	AF180817	1964	タイ
GIII	P72-1244	EF457905	1972	マレーシア
GIV	D1/JKTA4/88	AB600922	1988	インドネシア
GV	DENV-1/BR/BID-V2374/2000	FJ850070	2000	ブラジル

\*GenBank 登録番号

表2. 本研究で用いた DENV-1 輸入患者症例

患者番号	年齢	性	血清採取年	渡航国	決定遺伝子型*	推定遺伝子型**
08-14	40	M	2008	ベトナム	GI	-
08-92	20	M	2008	カンボジア	GI	-
04-40	28	M	2004	マレーシア	GI	-
07-27	32	M	2007	インドネシア	GI	-
12-54	35	M	2012	タイ	-	GI
11-60	33	F	2011	モルジブ	-	GI
11-61	30	M	2011	モルジブ	-	GI
10-14	20	M	2010	カンボジア	-	GI
08-80	40	F	2008	タイ	-	GI
10-57	6	M	2010	ラオス	-	GI
11-10	58	M	2011	フィリピン	GIV	-
12-05	31	F	2012	フィリピン	GIV	-
11-06	25	F	2011	インドネシア	GIV	-
05-18	46	M	2005	インドネシア	GIV	-
04-41	31	M	2004	ミクロネシア	GIV	-
04-47	37	F	2004	ミクロネシア	GIV	-
11-09	31	F	2011	インドネシア シンガポール	GIV	-
11-106	22	M	2011	フィリピン	GIV	-
12-80	48	M	2012	フィリピン	-	GIV
09-09	53	M	2009	東チモール	-	GIV
07-06	47	F	2007	フィリピン	-	GIV
06-71	34	M	2006	サモア	-	GIV

\*塩基配列に基づいた。

\*\*渡航国から推定された。

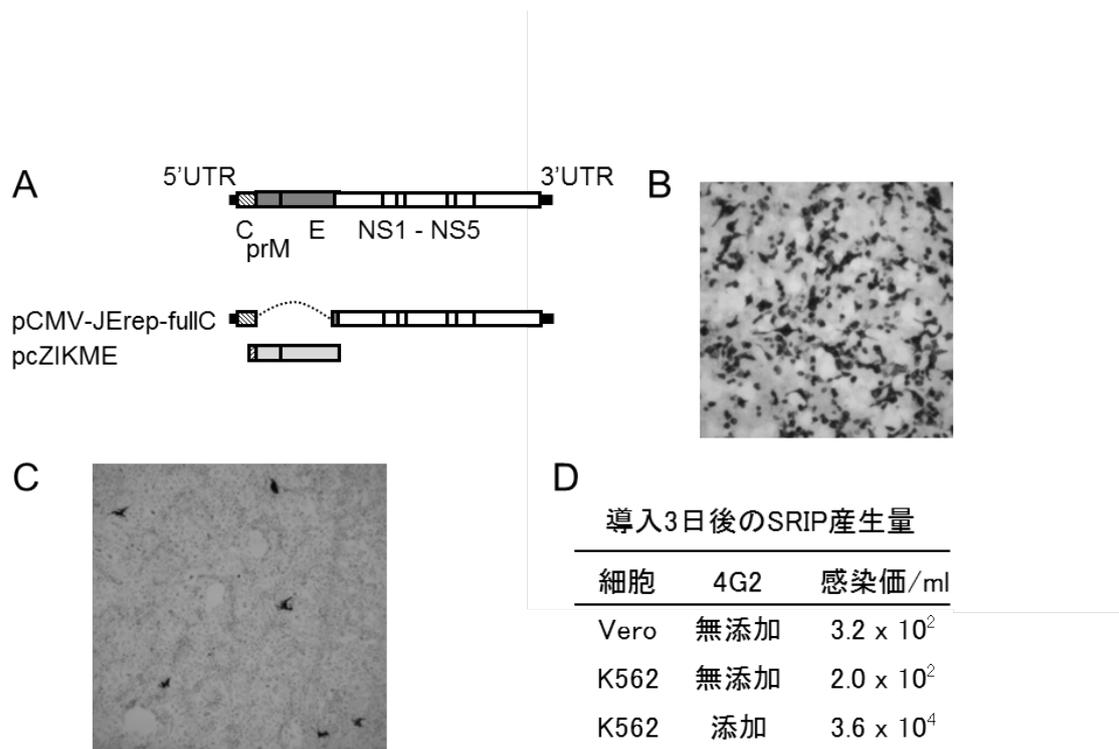


図1. ZIKV-SRIPの作製及び産生量。(A) ZIKV-SRIPを産生させるために用いた遺伝子の模式図。(B) pcZIKMEトランスフェクション2日後の293T細胞の4G2免疫染色像。(C) ZIKV-SRIP感染3日後のVero細胞の2D5免疫染色像。(D) pCMV-JErep-fullCとpcZIKMEをコトランスフェクション3日後の293T細胞培養液中に含まれたZIKV-SRIPの感染力価。

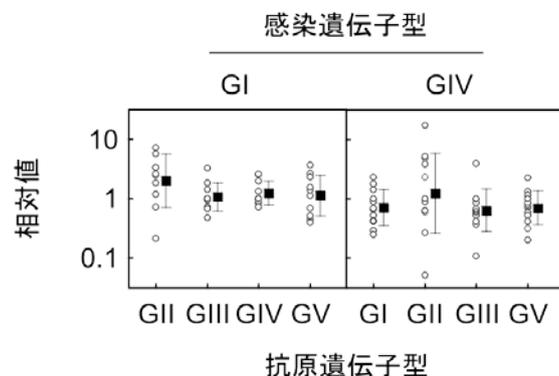


図2. DENV-1 の GI 株あるいは GIV 株に感染した、あるいは感染したことが推定される輸入感染症例における各遺伝子型の DENV-1 株に対する中和抗体価。感染遺伝子型で求められた中和抗体価に対する相対値で表した。白丸は個々のデータ、黒四角は平均値、エラーバーは標準偏差を示す。

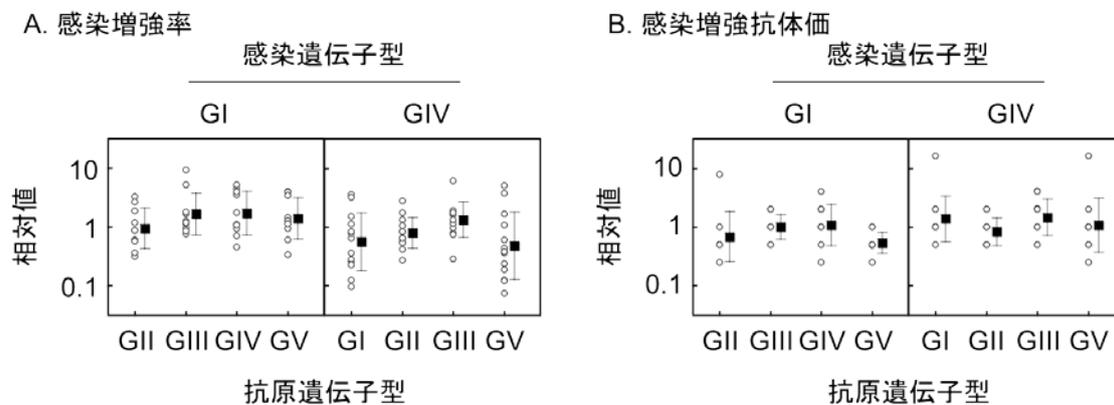


図3. DENV-1 の GI 株あるいは GIV 株に感染した、あるいは感染したことが推定される輸入感染症例における各遺伝子型の DENV-1 株に対する感染増強活性。感染増強率 (A) および感染増強抗体価 (B) を、感染遺伝子型で求められた中和抗体価に対する相対値で表した。白丸は個々のデータ、黒四角は平均値、エラーバーは標準偏差を示す。