

Shah Paresh Sumatilal 論文内容の要旨

主 論 文

Molecular characterization of attenuated Japanese encephalitis
live vaccine strain ML-17

日本脳炎馴化弱毒生ワクチン M-17 株の分子特性解析

Shah Paresh Sumatilal, Mariko Tanaka, Afjal Hossain Khan, Edward Gitau Matumbi Mathenge,
Isao Fuke, Mitsuo Takagi, Akira Igarashi, and Kouichi Morita

VACCINE

24 巻 4 号 402 - 411 2006 年

長崎大学大学院医学研究科病理系専攻
(指導教授：森田 公一 教授)

【緒 言】

日本脳炎ウイルスは、フラビウイルス科フラビウイルス属に属する蚊媒介性のウイルスであり世界保健機関の推計によるとアジア諸国では毎年 43,000 人もの日本脳炎患者が発生し、そのうち 11,000 人が死亡し、生き残った場合にも 9,000 人の患者には重篤な障害が残ると推定されている。吉田らは日本脳炎患者脳組織から分離した日本脳炎ウイルス野生株 Ja0H0566 株を低温培養細胞に段階的に馴化させ、弱毒生ワクチン株 ML-17 を樹立した(Yoshida et al, 1981)。この生ワクチンは動物用(ブタ)として実用化され、我が国で公的に認可され市販された唯一の日本脳炎生ワクチンであり、その有効性と安全性はすでに実証されている。この研究は ML-17 株の弱毒化機構を分子レベルで解析し、今後日本脳炎ウイルスを含む他のフラビウイルスの生ワクチン開発に向けた有用な知見を得ることを目的として Ja0H0566 株と ML-17 株の遺伝子塩基配列を解析比較するとともにリコンビナントウイルスを用いていくつかの遺伝子変異の重要性を検証したものである。

【対象と方法】

ウイルス及び細胞：日本脳炎ウイルス野生株 Ja0ArS982 株、Ja0H0566 株、弱毒化 ML-17 株の 3 種類の日本脳炎ウイルス株を用いた。ウイルスの増殖、および遺伝子導入にはヒトスジシマカ培養細胞クローン C6/36 細胞を用いた。プラーク法によるウイルスの力価測定には BHK-21 細胞、または PS 細胞を用いた。

ウイルス塩基配列の解析：C6/36 細胞で培養した Ja0H0566 株および ML-17 株の感染培養上清からウイルス RNA を抽出して、RT-PCR 法によりウイルス遺伝子断片を増幅して ABI310 オートシーケンサーを用いて塩基配列を決定した。RNA の 5' および 3' 末端の塩基配列はそれぞれ 5' および 3' RACE 法を用いて遺伝子 cDNA 断片を増幅したのちに塩基配列を決定した。

組み換え日本脳炎ウイルスの全長 cDNA の構築と組み換えウイルスの作製：Long PCR 法を用いて 5' 末端に T7 プロモーターを有する完全長の組み換え日本脳炎ウイルス遺伝子 cDNA を構築し、これを鋳型として試験管内で転写したウイルス RNA をエレクトロポレーション法により C6/36 細胞に導入して数日間培養したのち培養液中に出現したウイルスを回収してマウスにおける病原性の検証をふくむ種々の生物学的な特性について解析した。

【結 果】

ML-17 株とその親株である強毒 Ja0H0566 株の完全長遺伝子塩基配列を明らかにした。ML-17 株は親株と比較して、翻訳領域内で 23 ヶ所、非翻訳領域で 2 ヶ所、計 25 ヶ所の塩基配列の変異が

認められた。アミノ酸置換については、PrM/M 蛋白で 2 ヶ所、NS2A 蛋白で 1 ヶ所、NS4B 蛋白で 3 ヶ所、NS5 蛋白で 4 ヶ所の置換が認められた。すでに全塩基配列が報告されている他の 6 つの日本脳炎ウイルス野生株との遺伝子配列の比較では、ML-17 株に見られた 10 個のアミノ酸変異部位のうち 8 ヶ所は Ja0H0566 株を含む 7 つの野性株間で同じ配列であり高度に保存された部位に発生した変異であることが示された。

ML-17 株の構造蛋白領域(prM/M)内に見られた 2 つのアミノ酸変異の弱毒化への影響を検証するために、日本脳炎ウイルス野生株 Ja0ArS982 株の同部位を 1 つずつ変異させた変異体 2 株、MS-14(M127I)及び MS-15(N274T)、及びリバート 1 株を作出した。その結果、それぞれの変異体は、野生株と比較して小さなプラークサイズを示しさらにマウス神経毒性試験を行った結果、マウス神経侵襲性に減少が見られた。この結果、ML-17 の弱毒化には少なくとも構造蛋白上の 2 つの変異が寄与していることが明らかとなった。

【考 察】

各種フラビウイルスの弱毒化機構についてはすでいくつかの報告が発表されているが、その多くはウイルス粒子の表面抗原をコードした領域、即ち E 蛋白遺伝子領域に発生した変異である。今回、われわれが解析した ML-17 株については、この E 蛋白遺伝子は親株の強毒株と同一であり、E 蛋白の変異を伴わない弱毒化ウイルスとして ML-17 株はユニークなフラビウイルス生ワクチン株といえる。またヒト用の日本脳炎生ワクチンとして中国で開発された SA-14-14-2 株との比較においては、双方弱毒化に関連すると考えられる塩基配列、アミノ酸配列の変異はことなつた部位に認められ、今回報告した弱毒化マーカーは新しいものである。

構造蛋白の PrM/M 蛋白上に発生した変異は、組み替えウイルスを用いた実験の結果から弱毒化に関与していることが明らかになったが、この変異だけでは完全な弱毒化は得られなかった。このことから、ML-17 の弱毒化はおそらく非構造蛋白上のアミノ酸変異を含めた複数のアミノ酸変異の共同的な作用により達成されたものであることが示唆された。

昨今、西ナイルウイルスなどの新興感染症対策として、既存のフラビウイルス生ワクチン株遺伝子に西ナイルウイルスの E 蛋白遺伝子部位を入れ換えた組み換え生ワクチンを利用する可能性が示唆され、米国では実用化にむけた研究が進行中である。今回、ML-17 株の弱毒化は E 蛋白遺伝子以下の領域の変異によることが明らかとなり、わが国で開発された ML-17 株は組み換えフラビウイルス生ワクチンのバックボーンウイルスとして極めて有用であることが示唆された。