

明 細 書

発明の名称：

疑似ウイルスを使用した抗体依存性感染増強反応の評価法

技術分野

[0001] 本発明は、疑似ウイルスを使用した抗体の機能評価方法に関する。

背景技術

[0002] フラビウイルス科フラビウイルス属に属するデングウイルスは+鎖RNAウイルスであり、そのゲノムは3つの構造タンパク領域（C、p r M、E）と7つの非構造タンパク領域（NS1、NS2 a、NS2 b、NS3、NS4 a、NS4 b、NS5）から構成される。デングウイルスには4種類のウイルス（DENV-1～DENV-4）が存在し、生物学的分類上の階級は血清型である。デングウイルスは蚊によって媒介され、デングウイルス保有蚊がヒトを刺咬すると、注入されたウイルスはまず最初に皮内の樹状細胞や単球やリンパ球に感染し一次増殖する。その後、ウイルスは血流に乗って体内の各種臓器へと運ばれ二次増殖する。増殖したウイルスが血液中に存在する状態をウイルス血症と呼び、この時蚊が吸血するとその蚊は新たなウイルス保有蚊となり、他のヒトへウイルスを伝播することが可能となる。

[0003] デングウイルスの流行の中心は主要媒介蚊のネッタイシマカが生息する熱帯・亜熱帯地域であるが、近年は日本を含む温帯地域に生息するヒトスジシマカもデングウイルスを媒介することが知られている。2014年に関東地方を中心にデングウイルスの国内流行が発生した際は、ヒトスジシマカが媒介動物となった。デングウイルスに感染する可能性のあるリスク人口は39億人と見積もられており、この1/10の3.9億人が毎年何らかのデングウイルスに感染している。ヒトがデングウイルスに感染しても多くは不顕性感染のため、実際に症状が出るのはそのうち約1億人である。

[0004] 上述のように、多くの感染者は不顕性感染にとどまるが、一過性熱性疾患のデング熱を発症することがある。デング熱の主症状は発熱、頭痛、筋肉痛

、関節痛など比較的穏やかな病態を示す。デング熱のほとんどは軽症であるが、一部のデング熱患者は重症型のデング出血熱へと陥ることがある。デング出血熱の症状（血漿漏出、出血傾向）は重篤であるため、適切な治療が行われないと死に至ることがある。初感染ではデング熱を発症することが多いが、二度目の感染時に初回感染時と異なる血清型のデングウイルスに感染した場合、デング出血熱を発症するリスクが高くなることが疫学的に証明されている。三度目以降の感染はないと言われている。

[0005] デングウイルス感染における重症化メカニズムは完全には解明されていないが、ウイルス血症レベルが高いほど重症化に陥りやすいことが知られている。抗体依存性感染増強（ADE）は重症化発症機序の有力説の一つであり、高ウイルス血症を誘導する。ADEとは、本来ウイルスを中和するはずの抗体が、却ってウイルス感染を増悪させる現象のことである。ウイルスと結合した抗体は、細胞表面上のFcγ受容体を介して、細胞内へのウイルス侵入を促進し、感染を増大させる。

[0006] デングワクチン（Dengvaxia）の接種によって誘導された抗体がADEを示したことにより、ワクチン接種群で重症化症例が増えたとの報告がある。特に、デング抗体陰性者にこのワクチンを接種すると、疑似的に初回感染を起こすことになり、次回感染時に重症化のリスクが増加した。このことから、現在はデング抗体陽性者のみDengvaxiaを接種することが可能となっている。これまでの海外からの研究で、In vitroで確認されたADEがin vivoの重症化と相関するという疫学報告がある。

[0007] 感染症の抗体検査として簡便な迅速キット（イムノクロマト法、ELISA法）が市販されているが、いずれも化学的な定性・定量検査法であり、抗体の生物学的機能活性まではわからない。ADE試験の概略は、必要最低限のウイルス存在下に抗体を加えて、どの程度細胞への感染を増やすことができるのかを調べる試験である。固定細胞を用いたADEの評価法などが報告されている（非特許文献1）。既存のADE試験は、抗体のもつ生物学的機

能を調べることができるが、アッセイ抗原として生きたデングウイルスが必要である。デングウイルスは感染症法の第四類感染症に分類されるため取り扱う際はバイオセーフティレベル2（BSL2）の設備が必要である。また、この方法は結果が得られるまでに最低3日間を要するため、デング熱で入院した患者が重症化する前に結果を得ることは現実的に難しい。

[0008] Single Round Infectious Particles (SRIPs) は1回感染性粒子であり、SRIPs 作製時に特定のウイルスの外殻遺伝子を用いることで、そのウイルスの外殻を保有したSRIPs を作製することができる（非特許文献1～4）。SRIP内部にはレプリコンと呼ばれる自己複製能のある遺伝子が含まれている。SRIPs 感染細胞内で、レプリコン遺伝子は複製されるが、粒子（ウイルス）としては増幅できず、細胞破壊や再感染は起こさないため、安全に取り扱うことができる。レポーター遺伝子としてナノルシフェラーゼをコードすることにより、感染細胞をルシフェラーゼ活性で測定することができる。SRIPs は疑似ウイルスとして抗体と結合することから、抗体の中和活性やADE活性など、機能性抗体試験の抗原として使用可能である。SRIPs とそれが産生するルシフェラーゼ活性を利用したADE活性測定も報告されている（非特許文献4）が、この方法でも測定に3日間が必要であった。

[0009] 他の機能性抗体試験として、中和試験が挙げられる。中和試験は、大量に抗原（ウイルス）が存在するところに抗体を加えて、どの程度ウイルスを減らすことができるのかを調べる試験である。中和試験も従前はアッセイ抗原として生きたウイルスが必要であった。SRIPs を代替抗原として細胞に感染したSRIPs が産生するルシフェラーゼ活性を検知することによる中和試験が報告されている（非特許文献5～6）が、中和抗体との反応後にレプリコンが細胞内で増えるのに時間を要するため、3日間の培養が必要であった。

先行技術文献

非特許文献

- [0010] 非特許文献1: Eiji Konishiら、Journal of Virological Methods; 163: 360-367 (2010)
- 非特許文献2: Ryosuke Suzukiら、Journal of General Virology; 95: 60-65 (2014)
- 非特許文献3: Atsushi Yamanakaら、Vaccine; 32 (34): 4289-95 (2014)
- 非特許文献4: Atsushi Yamanakaら、Microbes and Infection; 18: 277-284 (2016)
- 非特許文献5: Atsushi Yamanakaら、Journal of General Virology: DOI 10.1099/jgv0.000669 (2017)
- 非特許文献6: Mami Matsudaら、Scientific Reports; DOI 10.1038/s41598-018-34865-y (2018)

発明の概要

発明が解決しようとする課題

- [0011] よって、中和試験及びADE試験を汎用化するため、安全な抗原を用いることができ、かつ、より早く結果が得られる方法が求められていた。

課題を解決するための手段

- [0012] 本発明者らは中和試験及びADE試験のアッセイ抗原として適したSingle Round Infectious Particles (SRIPs) について鋭意検討を行った。その結果、黄熱ウイルス (Yellow fever virus: YFV) の遺伝子をレプリコンプラスミドの骨格として使用することにより、急速にSRIPsが細胞内に取り込まれて加速的に複製し、これにより検出までの時間が短縮されることを見出し、抗体機能の迅速診断法の開発に成功した。

すなわち、本発明は以下に関する。

- [0013] [1] 標識タンパク質をコードする領域及び黄熱ウイルスゲノムの非構造 (

NS) タンパク質 1～5 をコードする領域を有する遺伝子、ウイルスのキャプシドタンパク質、及び評価対象ウイルスの外殻タンパク質 (Envelope) を有する 1 回感染性ウイルス粒子。

[2] 前記標識タンパク質をコードするが、前記 1 回感染性ウイルス粒子が感染した細胞内においてのみ発現可能である、[1] に記載のウイルス粒子。

[3] 前記標識タンパク質がナノルシフェラーゼである、[1] 又は [2] に記載のウイルス粒子。

[4] 評価対象ウイルスの外殻タンパク質がデングウイルスの外殻タンパク質である、[1] ～ [3] のいずれか 1 つに記載のウイルス粒子。

[5] CMV プロモーターが、前記標識タンパク質をコードする領域及び黄熱ウイルスゲノムの非構造 (NS) タンパク質 1～5 をコードする領域の遺伝子の発現を直接制御するように、該領域の上流に連結している、[1] ～ [4] のいずれか 1 つに記載のウイルス粒子。

[6] 黄熱ウイルスゲノムの非構造 (NS) タンパク質 1～5 をコードする領域及び標識タンパク質をコードする領域を有する遺伝子を有するベクター、ウイルスのキャプシドタンパク質をコードする遺伝子を有するベクター、及び評価対象ウイルスの外殻タンパク質をコードする遺伝子を有するベクターを動物細胞に感染させること、及び

感染細胞内で生成した [1] ～ [5] のいずれか 1 つに記載の 1 回感染性ウイルス粒子を回収すること、

を含む、[1] ～ [5] のいずれか 1 つに記載の 1 回感染性ウイルス粒子の製造方法。

[7] 前記ウイルスのキャプシドタンパク質をコードする遺伝子、及び／又は、評価対象ウイルスの外殻タンパク質をコードする遺伝子が CAG プロモーターにより直接制御されるように該 CAG プロモーターと連結している、[6] に記載の製造方法。

[8] 被検抗体の存在下で、Fcγ 受容体非発現細胞に [1] ～ [5] のい

いずれか1つに記載の1回感染性ウイルス粒子を接触させること、
前記細胞を24～48時間培養すること、及び
前記培養後の培養液中の標識を測定することを含む、
抗体の中和活性の判定方法であって、
測定された標識のレベルが陰性コントロール細胞において測定された標識
のレベルよりも低い場合には、該被検抗体が前記評価対象ウイルスに対して
中和活性を有すると判定される方法。

〔9〕前記Fcγ受容体非発現細胞がVero細胞である、〔8〕に記載の
方法。

〔10〕被検抗体の存在下で、Fcγ受容体発現細胞に〔1〕～〔5〕のい
ずれか1つに記載の1回感染性ウイルス粒子を接触させること、

前記細胞を30分～24時間培養すること、及び
前記培養液中の標識を測定することを含む、
抗体の抗体依存性感染増強能の判定方法であって、
前記測定された標識のレベルが、陰性コントロール細胞において測定され
た標識のレベルよりも高い場合には、該被検抗体が前記評価対象ウイルスに
ついて抗体依存性感染増強能を有すると判定される方法。

〔11〕前記Fcγ受容体発現細胞が、K562細胞又はMyel細胞であ
る、〔10〕に記載の方法。

〔12〕前記Fcγ受容体発現細胞が、2～16時間培養されることを特徴
とする、〔10〕又は〔11〕に記載の方法。

〔13〕1回感染性ウイルス粒子の希釈度が2倍以上である、〔10〕～〔
12〕のいずれか1つに記載の方法。

〔14〕Fcγ受容体発現細胞の培養が、96ウェルプレート中、 2.1×10^2 細胞／ウェル以上のFcγ受容体発現細胞を用いて行われる、〔10〕
～〔13〕のいずれか1つに記載の方法。

〔15〕前記1回感染性ウイルス粒子の接触の前、あるいは、前記1回感染
性ウイルス粒子の接触と同時に、被検抗体を含有する組成物が培養液に添加

されることを含む、[10]～[14]のいずれか1つに記載の方法。

[16] 前記1回感染性ウイルス粒子と被検抗体を含有する組成物の混合物が培養液に添加される、[15]に記載の方法。

[17] 前記被検抗体を含有する組成物が、被験者由来の血清である、[15]又は[16]に記載の方法。

[18] 前記被検抗体を含有する組成物が、10～10240倍希釈された被験者由来の血清である、[17]に記載の方法。

[19] [1]～[5]のいずれか1つに記載の1回感染性ウイルス粒子を有効成分として含有する、抗体機能判定用組成物。

[20] 抗体機能が抗体依存性感染増強能又は中和活性である、[19]に記載の抗体機能判定用組成物。

[21] [6]～[18]のいずれか1つに記載の方法に使用するための、[19]又は[20]に記載の抗体機能判定用組成物。

[22] [1]～[5]のいずれか1つに記載の1回感染性ウイルス粒子を有効成分として含有する、抗体機能判定用キット。

[23] 更に、陰性コントロール抗体又は標準抗体を含有する、[22]に記載のキット。

[24] 更に、Fcγ受容体発現細胞を含有する、[22]又は[23]に記載のキット。

発明の効果

[0014] 本発明のYFVレプリコンを有するSRIPsを用いることにより、従来（3日間）よりも短期間（1～2日）で抗体の機能を判定することができることから、迅速な抗体試験を行うことができる。これにより、被験者が再感染によりADEを起こす可能性を迅速に判定することができるほか、医薬品としての抗体開発における性能評価（中和活性評価）やワクチンのADE活性抗体誘導能の評価に用いることができる。

図面の簡単な説明

[0015] [図1] SRIPを作製するために必要な3種類のプラスミドの情報（Mat s

uda et al., Sci Rep. 2018より一部改変) および、SRIPの作製方法や構成成分を模式的に表した図である。

[図2]デングウイルスSRIPを抗原濃度依存的に培養細胞(K562、MyIcまたはVero細胞)に感染させ、24-48時間後の細胞内のルシフェラーゼ活性を測定した結果を示す図であり、Aはデング1型ウイルスSRIP(D1-SRIP)の詳細な結果、Bはデング2~4型ウイルスSRIP(D2-SRIP~D4-SRIP)の結果である。

[図3]D1-SRIPに対するデング抗体陽性ヒト血清の中和活性を、Vero細胞を用いて48時間後のルシフェラーゼ活性を測定した結果を示す図である。

[図4]D1-SRIPに対するデング抗体陽性ヒト血清の感染増強活性を、K562細胞を用いて24時間後の(A)ルシフェラーゼ活性を測定した結果および(B)Fold Enhancementに換算した結果を示す図である。

[図5]D1-SRIPに対するデング抗体陽性ヒト血清の感染増強活性を、MyIc細胞を用いて24時間後の(A)ルシフェラーゼ活性を測定した結果および(B)Fold Enhancementに換算した結果を示す図である。

[図6]D2-SRIP~D4-SRIPに対するデング抗体陽性ヒト血清の感染増強活性を、K562およびMyIc細胞を用いて24時間後のルシフェラーゼ活性を測定し、Fold Enhancementに換算した結果を示す図である。

[図7]D1-SRIPに対するデング抗体陽性ヒト血清の感染増強活性を、K562およびMyIc細胞を用いて感染30分~16時間後の(A)ルシフェラーゼ活性を測定した結果および(B)Fold Enhancementに換算した結果を示す図である。

[図8]D1-SRIPに対するデング抗体陽性ヒト血清の感染増強活性を、高濃度のSRIP抗原および低~高密度のK562/MyIc細胞を用いて5

時間後のルシフェラーゼ活性を測定し、Fold Enhancementに換算した結果を示す図である。

[図9] D1-SRIPに対するデング抗体陽性ヒト血清の感染増強活性を、低濃度のSRIP抗原および低～高密度のK562/Myic細胞を用いて48時間後のルシフェラーゼ活性を測定し、Fold Enhancementに換算した結果を示す図である。

[図10]最適化された条件下で感染増強試験を行い、D1-SRIP～D4-SRIPに対するデング抗体陽性ヒト血清の濃度依存性感染増強活性の結果を示す図である。

発明を実施するための形態

[0016] (1回感染性ウイルス粒子(SRIPs))

本発明は、標識タンパク質をコードする領域及び黄熱ウイルスゲノムの非構造(NS)タンパク質1～5をコードする領域を有する遺伝子、ウイルスのキャプシドタンパク質、及び評価対象ウイルスの外殻タンパク質(Envelope)を有する、1回感染性ウイルス粒子(SRIPs)に関する。

[0017] 本明細書のSRIPsは、その遺伝子中に、標識タンパク質をコードする領域と、黄熱ウイルスゲノムの非構造(NS)タンパク質1～5をコードする領域とを有する。「標識タンパク質」は、前記SRIPsが感染した細胞を標識可能なタンパク質であれば特に限定されるものではないが、好ましくは、前記SRIPsが感染した細胞内においてのみ発現可能である。また、標識タンパク質は、好ましくは蛍光タンパク質又は発光タンパク質であり、具体的には、緑色蛍光タンパク質(GFP)、赤色蛍光タンパク質(RFP)、青色蛍光タンパク質(BFP)、シアン色蛍光タンパク質(CFP)、黄色蛍光タンパク質(YFP)、これらの蛍光タンパク質から改良された蛍光タンパク質(<https://www.fpbases.org/>を参照)、ルシフェラーゼ、及びナノルシフェラーゼを挙げることができる。

[0018] 黄熱ウイルスは、フラビウイルス科フラビウイルス属に属するウイルスで、1本鎖のプラスRNAをゲノムとする。よって、本明細書において、「遺

伝子」はDNAであってもRNAであってもよい。フラビウイルス属のウイルス粒子は、1本鎖RNAにキャプシドタンパク質（コアタンパク質とも呼ばれる）が結合したヌクレオキャプシドが、膜タンパク質及びエンベロープタンパク質により囲まれている。1本鎖RNA上には一つの読み取り枠があり、3種類の構造タンパク質（C、p r M、E）と、7種類の非構造タンパク質（NS1、NS2A、NS2B、NS3、NS4A、NS4B、NS5）がコードされている。「黄熱ウイルスゲノムの非構造（NS）タンパク質1～5」とは、この7種類の非構造タンパク質を意味する。なお、実質的にこれらのタンパク質と同一と考えられ、本発明の効果に影響がない限り、これらのタンパク質の一部（例えば、1～5個のアミノ酸）に変異が入ったタンパク質も黄熱ウイルスゲノムの非構造（NS）タンパク質1～5に含まれる。

[0019] 本明細書のSRIPsの遺伝子は、必要に応じて、上述の標識タンパク質をコードする領域、及び、黄熱ウイルスゲノムの非構造（NS）タンパク質1～5をコードする領域以外の領域を有していてもよいが、1回感染性の機能を獲得するため、少なくとも（i）キャプシドタンパク質、及び、（ii）膜タンパク質とエンベロープタンパク質のいずれか一方、あるいは両方をコードする遺伝子領域を含まない。すなわち、本明細書のウイルス粒子は、評価対象ウイルスのEnvelopeを有することから、評価対象ウイルスが感染する細胞に対しては感染することができる一方で、その遺伝子はキャプシドタンパク質、及び／又は、Envelopeや膜タンパク質前駆体をコードしないことから、感染細胞内で増殖することができない。

[0020] 例えば、標識タンパク質をコードする領域、及び黄熱ウイルスゲノムの非構造（NS）タンパク質1～5をコードする領域は、感染評価試験において使用する細胞内において発現可能な転写調節領域に結合していてもよい。このような転写調節領域は、プロモーターを含有していてもよい。プロモーターとしては、前記細胞内において活性を有するプロモーターであれば特に限定されるものではなく、例えば恒常的プロモーターであってもよく、具体的

には、サイトメガロウイルス（CMV）プロモーター、ラウス肉腫ウイルス（RSV）プロモーター、CAGプロモーター（サイトメガロウイルスのエンハンサーとニワトリの β -アクチンのプロモーターと、ウサギの β -グロビン遺伝子のスプライシングアクセプターを有するプロモーター）、ユビキチンプロモーター、サルウイルス40（SV40）プロモーター、及び伸長因子1 α （EF-1 α ）プロモーターを挙げることができる。プロモーターは、前記タンパク質をコードする領域の発現を直接制御するように、該領域の上流に連結する。

[0021] 本明細書のSRIPsの有する「ウイルスのキャプシドタンパク質」は、前記RNA遺伝子と結合してヌクレオキャプシドを形成するタンパク質である。キャプシドタンパク質の由来するウイルスは、フラビウイルス科に属するウイルスであれば特に限定されるものではないが、例えば、黄熱ウイルス（YFV）、デングウイルス（DENV）、日本脳炎ウイルス（JEV）、ウエストナイルウイルス（WNV）、及びダニ媒介性脳炎ウイルス（TBEV）を挙げることができ、好ましくは、YFV又はDENVである。

[0022] 外殻タンパク質（Envelope）は、ウイルスの外殻を構成するタンパク質であり、受容体との結合や膜融合の機能を果たす。Envelopeが由来する評価対象ウイルスとしては、上述のフラビウイルス属に属するウイルスであれば特に制限されるものではなく、例えば、DENVであってよい。DENVには、1型～4型の4種が存在し、それぞれ、DENV-1、DENV-2、DENV-3、DENV-4と呼ばれている。本明細書全般にわたって、DENVは、DENV-1～DENV-4のいずれか1種類、又は複数であってもよいし、全てであってもよい。

[0023] 本明細書のSRIPsは、上述の他に、膜タンパク質を含んでいてもよい。

[0024] 本明細書のSRIPsは、標識タンパク質をコードする領域及び黄熱ウイルスゲノムの非構造（NS）タンパク質1～5をコードする領域を有する遺伝子を含むレプリコンベクター、キャプシドタンパク質をコードする遺伝子

を含むベクター、及びEnvelopeをコードする遺伝子、及び膜タンパク質前駆体（prM）をコードする遺伝子を含むベクターを、同一の細胞内に導入することにより得ることができる（図1）。よって、本発明は、黄熱ウイルスゲノムの非構造（NS）タンパク質1～5をコードする領域及び標識タンパク質をコードする領域を有する遺伝子を有するベクター、ウイルスのキャプシドタンパク質をコードする遺伝子を有するベクター、及び評価対象ウイルスの外殻タンパク質をコードする遺伝子を有するベクターを動物細胞に導入させること、及び導入細胞内で生成したSRIPsを回収すること、を含む、SRIPsの製造方法に関する。ベクターとしては、好ましくはプラスミドベクターである。動物細胞としては、ヒト細胞又はサル細胞であって良く、例えば、HEK293T細胞を使用することができる。各ウイルス遺伝子は、本技術分野において公知であり、各種データベース等から入手することができる。

[0025] （中和活性評価）

前記SRIPsを、被検抗体の存在下でFcγ受容体非発現細胞に感染させることにより、短時間で抗体の中和活性を測定することができる。よって、本発明は、被検抗体の存在下で、Fcγ受容体非発現細胞に前記SRIPsを接触させること、前記細胞を24～72時間培養すること、及び前記培養後の培養液中の標識を測定することを含む、抗体の中和活性の判定方法であって、測定された標識が、抗体非存在下又は陰性コントロール抗体存在下でSRIPsを同様に接触させた陰性コントロール細胞において測定された標識よりも少ない場合には、該被検抗体が前記評価対象ウイルスに対して中和活性を有すると判定される方法に関する。

[0026] Fcγ受容体非発現細胞としては、Fcγ受容体を発現していない細胞であればよく、好ましくは上皮系の細胞であり、例えば、ヒト又は霊長類（サル、チンパンジーなど）の細胞であって良い。Fcγ受容体非発現細胞として具体的にはVerocellsを挙げることができる。

[0027] 被検抗体の存在下における、Fcγ受容体非発現細胞への前記SRIPs

の接触は、被検抗体をFcγ受容体非発現細胞の培養液に添加した後、又は添加と同時に前記SRIPsを培養液に添加することにより行ってもよいし、被検抗体と前記SRIPsとを予め混合してFcγ受容体非発現細胞の培養液に添加してもよい。例えば、事前に被検抗体とSRIPsを混合して約37℃で1～6時間（好ましくは、2時間）静置後、Fcγ受容体非発現細胞に接触させてもよい。被検抗体としては、精製抗体の他、抗体組成物を用いることができ、例えば、被験者由来の血清をそのまま、又は希釈して用いてもよい。希釈する場合、5120倍以下、640倍以下、320倍以下、160倍以下、80倍以下、40倍以下、又は10倍以下とすることができる。

[0028] 被検抗体の存在下でSRIPsを接触させる時間は、24時間以上72時間未満であり、好ましくは、24～48時間である。

[0029] 標識の測定は選択した標識の種類に応じて適宜行うことができる。例えば、発光はルミノメーターを用いて行うことができる。

[0030] 測定された標識のレベルを、陰性コントロールの標識のレベルと比較することにより、中和活性の判定を行う。陰性コントロールとは、中和活性が存在しない条件下であることの他は、被検抗体についての試験と同条件でSRIPsを感染させたFcγ受容体非発現細胞である。具体的には、陰性コントロールは、被検抗体の非存在下でSRIPsを感染させたFcγ受容体非発現細胞であるか、あるいは、中和活性を持たないことが明らかな抗体（例えば、評価対象ウイルスに結合しない抗体）の存在下でSRIPsを感染させたFcγ受容体非発現細胞であってよい。陰性コントロールの標識のレベルは、被検抗体と同時に上記中和活性評価方法を実施することにより得ることもできるし、被検抗体とは別に上記中和活性評価方法を実施して得てもよい。陰性コントロールと比較して、標識のレベルが低い場合、当該被検抗体は中和活性を有すると判定することができる。例えば、被検抗体として患者血清を使用した場合、陰性コントロールと比較して、当該血清存在下での標識のレベルが低い場合、当該患者は中和活性を有する抗体を有すると判定す

ることができる。

[0031] 本明細書全体において、「レベル」とは、数値化された存在量に関する指標を意味し、例えば、濃度、量あるいはその代わりとして用いることができる指標を含む。よって、レベルは蛍光強度等の測定値そのものであってもよいし、濃度に換算された値であってもよい。また、レベルは、絶対的な数値（存在量、単位面積当たりの存在量など）であっても良いし、又は必要に応じて設定された比較対照と比較した相対的な数値であってもよい。

[0032] （抗体依存性感染増強（ADE）能評価）

前記SRIPsを、被検抗体の存在下でFc γ 受容体発現細胞に感染させることにより、短時間で抗体の抗体依存性感染増強能（ADE）を測定することができる。よって、本発明は、被検抗体の存在下で、Fc γ 受容体発現細胞に前記SRIPsを接触させること、前記細胞を30分～24時間培養すること、及び前記培養液中の標識を測定することを含む、抗体の抗体依存性感染増強能の判定方法であって、前記測定された標識のレベルが、陰性コントロール細胞において測定された標識のレベルよりも高い場合には、該被検抗体が前記評価対象ウイルスについて抗体依存性感染増強能を有すると判定される方法に関する。

[0033] Fc γ 受容体発現細胞としては、Fc γ 受容体を発現している細胞であればよく、好ましくは免疫系の細胞であり、例えば、ヒト又は霊長類（サル、チンパンジーなど）の細胞であって良い。Fc γ 受容体発現細胞として具体的には、My1c細胞（マイキャンテクノロジーズ株式会社、日本）及びK562細胞を挙げることができる。

[0034] 被検抗体の存在下における、Fc γ 受容体発現細胞への前記SRIPsの接触は、被検抗体をFc γ 受容体発現細胞の培養液に添加した後、又は添加と同時に前記SRIPsを培養液に添加することにより行ってもよいし、被検抗体と前記SRIPsとを予め混合してFc γ 受容体発現細胞の培養液に添加してもよい。被検抗体としては、精製抗体の他、抗体組成物を用いることができる。抗体組成物としては、例えば、被験者由来の血清をそのまま、

又は希釈して用いてもよい。希釈する場合、10倍以上、40倍以上、1600倍以上とすることができ、かつ／又は、10240倍以下、2560倍以下、640倍以下とすることができ、あるいは、これらの上限値と下限値の任意の組み合わせ、例えば、10倍以上10240倍以下、40倍以上2560倍以下であってもよい。また、上記方法により得られたSRIPsは、適宜希釈して本方法に用いることができる。この場合の希釈度は、2倍以上とすることができ、例えば、10倍またはそれ以上、100倍以上、又は1000倍以上であってもよい。

[0035] 細胞培養は、例えば、96ウェルプレートなどの免疫細胞を培養可能なプレート上で行うことができる。培養する細胞数は96ウェルプレートを用いた場合、 6.9×10 細胞／ウェル以上、 2.1×10^2 細胞／ウェル以上、 6.2×10^2 細胞／ウェル以上、 1.9×10^3 細胞／ウェル以上、 5.6×10^3 細胞／ウェル以上、又は 1.7×10^4 細胞／ウェル以上とすることができる。培養する細胞数は、SRIPsの希釈度、使用する細胞に応じて適宜設定することができる。例えば、Myic細胞を使用する場合、96ウェルプレート上の細胞数は、 1.9×10^3 細胞／ウェル以上とすることが好ましい。

[0036] 被検抗体の存在下でSRIPsを細胞に接触させる時間（被検抗体及びSRIPs存在下での細胞培養時間）は、30分間～24時間であり、例えば、2～24時間、5～24時間、30分間～16時間、2～16時間、又は5～16時間とすることもできる。

[0037] 標識の測定は選択した標識の種類に応じて適宜行うことができる。例えば、発光はルミノメーターを用いて行うことができる。

[0038] 測定された標識のレベルを、陰性コントロールの標識のレベルと比較することにより、ADE能の判定を行う。陰性コントロールとは、中和活性が存在しない条件下であることの他は、被検抗体についての試験と同条件でSRIPsを感染させたFc γ 受容体発現細胞である。具体的には、陰性コントロールは、被検抗体の非存在下でSRIPsを感染させたFc γ 受容体発現

細胞であるか、あるいは、A D E能を持たないことが明らかな抗体（例えば、評価対象ウイルスに結合しない抗体）の存在下でS R I P sを感染させたF c γ 受容体発現細胞であってよい。陰性コントロールの標識のレベルは、被検抗体と同時に上記A D E評価方法を実施することにより得ることもできるし、被検抗体とは別に上記A D E評価方法を実施して得てもよい。陰性コントロールと比較して、標識のレベルが高い場合、当該被検抗体はA D E能を有すると判定することができる。例えば、被検抗体として患者血清を使用した場合、陰性コントロールと比較して、当該血清存在下での標識のレベルが高い場合、当該患者はA D E能を有する抗体を有すると判定することができる。

[0039]（抗体機能判定用組成物）

上述の通り、本発明のS R I P sは、抗体の機能（中和活性、A D E能）の測定に使用することができることから、本発明は、前記S R I P sを有効成分として含有する、抗体機能判定用組成物に関する。ここで、抗体機能は、ウイルスの感染に関連する機能であり、代表的には中和活性又は抗体依存性感染増強能である。本発明の組成物は、前記中和活性評価方法又はA D E能評価方法に使用するための組成物とすることができる。組成物は、前記S R I P sの他、安定化剤、緩衝液などの成分を含むことができる。

[0040]（抗体機能判定用キット）

また、本発明は前記S R I P sを含有する、抗体機能判定用キットに関する。ここで、抗体機能は、ウイルスの感染に関連する機能であり、代表的には抗体依存性感染増強能又は中和活性である。当該キットは、更に、陰性コントロール抗体若しくは標準抗体、及び／又は、F c γ 受容体非発現細胞（抗体機能が中和活性の場合）若しくはF c γ 受容体発現細胞（抗体機能がA D Eの場合）を含有していてもよい。本発明のキットは、更に、外箱、容器、希釈剤、培養液、及び／又は説明書を含んでいてもよい。本発明の抗体機能判定用キットは、異なる構成成分が別々の容器中に包装され、一つのキットに含まれていてもよいし、あるいは、一部の構成成分（少なくとも、前記

S R I P sを含む)のみがキットに含まれ、別の構成成分がキットとは別に提供されていてもよい。

[0041] 以下に実施例を用いて本発明をより詳細に説明するが、これは本発明の範囲を限定するものではない。なお、本願明細書全体を通じて引用する文献は、参照によりその全体が本願明細書に組み込まれる。

[0042] (実施例1) S R I P sの作製

既報 (Matsuda, M. ら, Sci Rep; 8: 16624 (2018)) の手順に従い Deng 1 型ウイルス、Deng 2 型ウイルス (JX042506)、Deng 3 型ウイルス (EU081222)、Deng 4 型ウイルス (AY618988) の prM/E 遺伝子情報を元にルシフェラーゼ発現 S R I P を作製した。S R I P s 作製過程の模式図を図1に示す。

[0043] (1) レプリコンプラスミドの構築

具体的には、黄熱ウイルス (YFV) の 17D-204 strain を用いて、YFV サブジェノミックレプリコンプラスミドを構築した (図1丸1)。ウイルスRNAはYFV感染Ver o細胞から抽出し、cDNAへとリバーサ転写し、サイトメガロウイルス (CMV) プロモーター、口蹄疫ウイルス (FMDV) 2A 遺伝子の前にナノルシフェラーゼ (NanoLuc) 遺伝子、及びデルタ肝炎ウイルスリボザイム (HDV-RZ) を含む個別の dsDNA 断片として増幅させた。NanoLuc 遺伝子はC-コーディング領域から21aa後の位置、NanoLuc 遺伝子の後にRMDV-2A 遺伝子が続き、Eタンパク質をコードする領域のC-末端膜貫通ドメインの24aa前に導入した。レプリコン長cDNAの産生に必要ないくつかの個別の断片は低コピー数プラスミド pACYC177 に挿入し、pCMV-YF-nluc-rep と名付けた。

[0044] (2) キャプシド発現プラスミドの構築

YFV を感染させた Ver o細胞からRNAを抽出し、cDNAへとリバーサ転写した。得られたcDNAから101aaの成熟カプシド (C) をコードするcDNAを増幅した。得られたフラグメントをpCAGGSにクロ

ーニングしてYFVのカプシドを発現するプラスミドpCAG-YF-Cを構築した(図1丸2)。

[0045] (3) prME-発現プラスミドの構築

デング1型ウイルス(DENV-1)(D1/Hu/Saitama/NIID100/2014)のプレメンブレン/メンブレン(prM/M)、及びエンベロープ(E)タンパク質をコードするプラスミドpcD1ME^{YG1}は既報の方法により調製した(Konishiら、Vaccine; 24(12): pp. 2200-2207(2006))。それぞれ、デング2型ウイルス(DENV-2)(D2/New Guinea C/1944)、デング3型ウイルス(DENV-3)(D3/SG/05K4454DK1/2005)、及びデング4型ウイルス(DENV-4)(D4/Thailand/0476/1997)のプレメンブレン/メンブレン(prM/M)、及びエンベロープ(E)タンパク質をコードするプラスミドpcD2ME、pcD3ME^{SG}、pcD4METhは、既報の方法により調製した(Yamanaka, Aら(2014)、Matsuda, M.ら(2018)上掲)(図1丸3)。

[0046] (4) SRIPsの産生

293T細胞を10cmディッシュ中で増殖させ、ポリエチレンアミンを用いて3種類のプラスミドでコトランスフェクトした(図1): 2.5µgのレプリコンプラスミド、1.25µgのYFVキャプシド-発現プラスミド、及び1.25µgの各DENVprME-発現プラスミド。トランスフェクションの2日後に培地を除去して、10mM HEPES緩衝液を含有する新しい培地と交換した。トランスフェクションの3日後に培地を回収してSRIPsとして使用した。精製したSRIPsの感染力価は感染したVero細胞をルシフェラーゼアッセイすることにより見積もった(図2)。YFVのキャプシド(C)及びレプリコンプラスミド及びDENV-1プレメンブレン/メンブレン(prM/M)、及びエンベロープ(E)から構成されるSRIPsをD1-SRIPsと命名した。同様にYFVのキャプシ

ド (C) 及びレプリコンプラスミド及びDENV-2、DENV-3及びDENV-4 プレメンブレン／メンブレン (prM/M)、及びエンベロープ (E) から構成されるSRIPsを、それぞれD2-SRIPs、D3-SRIPs、及びD4-SRIPsと命名した。

[0047] (実施例2) SRIP感染実験

Fcγ受容体発現細胞としてヒト白血病細胞であるK562細胞および不活化ミエロイド系細胞であるMylic細胞 (マイキャンテクノロジー株式会社) を使用した。また、比較例としてデングウイルス感染実験でよく使用されるVerocell (Fcγ受容体非発現) を用いた。培養液として、K562細胞にはRPMI-1640を、Mylic細胞にはα改変型イーグル最小必須培地 (αMEM) を、Verocellにはダルベッコ改変イーグル培地 (DMEM) を用い、それぞれに10%ウシ胎児血清 (FBS) 添加して使用した。段階希釈したD1-SRIPs 40 μLを各細胞 (0.25~1.0×10⁵個) に接種し、37℃で2時間吸着させた後、温めた培養液を各ウェルに100 μL分注し、さらに37℃で培養した。24~48時間後に細胞をウェル当たり300 μLのリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で1回洗浄して、Promega社のPassive Lysis 5X Buffer (E1941) 30 μLで細胞溶解した。十分に攪拌した後、細胞溶解液10 μLとルシフェラーゼ基質Promega社のNano-Glo (登録商標) Luciferase Assay System (N1110) 10 μLを白色マイクロプレート内で混合し、Promega社の96ウェルプレート対応ルミノメーターGloMax (登録商標) Navigator Systemでルシフェラーゼ活性を測定した。同様に、K562細胞およびMylic細胞にD2-SRIPs、D3-SRIPs、及びD4-SRIPsを感染させてそのルシフェラーゼ活性を測定した。

[0048] D1-SRIPsの結果を図2Aに示す。いずれの細胞からも抗原希釈度に依存的なルシフェラーゼ活性が検出された。このことはSRIPsが、K562、Mylic、及びVerocellに感染し、細胞内で複製可能であるこ

とを示唆している。また、K562細胞を用いて、24時間と48時間培養で得られるルシフェラーゼ活性を比較したところ、24時間培養でもルシフェラーゼ活性は十分に検知できるが、培養時間が短いと明白にルシフェラーゼ活性が減少した。

[0049] 同様に、D2-SRIPs、D3-SRIPs、及びD4-SRIPsの結果を図2Bに示す。いずれのSRIPも抗原濃度依存的にルシフェラーゼ活性が検出された。

[0050] (実施例3) D1-SRIPsを用いた機能性抗体試験 (Vero細胞)

Vero細胞を96穴マイクロプレート(1ウェルあたり 0.25×10^5 個)に継代した。その翌日に10~10240倍に段階希釈したデング抗体陽性血清(2検体: #1、#2) 75 μ Lと等量の100倍希釈したD1-SRIPs 75 μ Lを混合し、37℃で2時間反応させ、血清-SRIP混合液を前日に継代したVero細胞(Fc γ 受容体非発現細胞)に40 μ L接種し、37℃でさらに2時間吸着させた。その後、温めた10%FBS添加DMEMを各ウェルに100 μ L分注し、37℃で48時間培養後に細胞内のルシフェラーゼ活性を測定した。

[0051] 結果を図3に示す。血清希釈度が低い(=抗体濃度が高い)条件ではルシフェラーゼ活性が抑制された(=SRIPsによる感染が中和された)が、血清希釈度が高くなるとルシフェラーゼ活性は血清非添加Controlの値に近づいた。#1と#2の中和活性を比較すると、#1は1:160でルシフェラーゼ活性が上昇し始めるのに対し、#2は1:320血清希釈条件でも十分にルシフェラーゼ活性が低いことから、#2の方が中和活性が高いと考えられた。これより、血清希釈度が低い又は抗体濃度が比較的高い条件でSRIPsを用いることにより、抗体の中和活性を調べることが示された。

[0052] (実施例4) D1-SRIPsを用いた機能性抗体試験 (K562細胞)

K562細胞は、培養フラスコ底面に接着する準接着細胞のみを選択的に継代し、本試験に用いた。まず、96穴ポリリジンコートマイクロプレー

ト内に希釈した（1：500）デング抗体陽性血清（＃1）36 μ Lと等量のD1-SRIP（1：10～1：1000希釈）36 μ Lを混合して37℃で2時間反応させた後、 1×10^4 個、 5×10^4 個または 1×10^5 個のK562細胞（Fc γ 受容体発現細胞）50 μ Lと混合した。37℃で24時間培養後、細胞内のルシフェラーゼ活性を測定した。同じ実験を血清非添加条件下で行い、Controlとした。

[0053] 結果を図4Aに示す。血清非添加Controlの値に比べて、希釈血清を加えた群ではルシフェラーゼ活性の上昇がADE作用として確認された。細胞数に比例してルシフェラーゼ活性は増加した。SRIP抗原濃度もまたルシフェラーゼ活性と正の相関があった。さらに、ADE活性を客観的な数値で評価するために、Fold enhancementを求めた（図4B）。Fold enhancementは、図4Aのデータに基づき、血清添加検体のルシフェラーゼ活性（指数）から血清非添加Controlのルシフェラーゼ活性を差し引くことで求めた。Fold enhancementは、SRIP抗原濃度と反比例の傾向が示唆された。

[0054] （実施例5）D1-SRIPsを用いた機能抗体試験（MyIc細胞）

同様に、96穴ポリリジンコートマイクロプレート内に希釈した（1：500）デング抗体陽性血清（＃1）36 μ Lと等量のデング1型-SRIP（1：10～1：1000希釈）36 μ Lを混合して37℃で2時間反応させた後、 1×10^4 個、 5×10^4 個、または 1×10^5 個のMyIc細胞（Fc γ 受容体発現細胞）50 μ Lと混合した。37℃で24時間培養後、細胞内のルシフェラーゼ活性を測定した。同じ実験を血清非添加条件下で行い、Controlとした。

[0055] 結果を図5Aに示す。K562細胞を用いた時と同様に、血清非添加Controlの値に比べて、希釈血清を加えた群ではルシフェラーゼ活性の上昇が見られた。K562細胞とは異なり、MyIc細胞では細胞数に反比例してルシフェラーゼ活性は減少した。一方、SRIP抗原濃度はルシフェラーゼ活性と正の相関があった。さらに、Fold enhancement

を求めたところ、SRIP抗原濃度と反比例の傾向が示唆された（図5B）。

[0056] 以上のことより、Fc γ 受容体発現細胞（K562およびMyIc細胞）とSRIPsを組み合わせる用いることにより、血清中のデング抗体のADE活性を測定できることがわかった。Fold enhancementのデータより（図4B及び図5B）、K562細胞は最大で約10000倍感染増強し、MyIc細胞は最大で約1000倍であった。K562細胞とMyIc細胞との比較では、K562細胞の方が高いFold enhancementを示した。また、Fold enhancementは、SRIP抗原濃度と反比例の関係にあることが示唆された。

[0057] （実施例6）D2-SRIPs、D3-SRIPs、及びD4-SRIPsを用いたADE活性測定試験

96穴ポリリジンコートマイクロプレート内に希釈した（1：100）デング抗体陽性血清（#1）36 μ Lと等量のD2-SRIPs、D3-SRIPsまたはD4-SRIPs（各1：100希釈）36 μ Lを混合して37 $^{\circ}$ Cで2時間反応させた後、 $1.5 \times 10^3 \sim 4.8 \times 10^4$ のK562またはMyIc細胞（Fc γ 受容体発現細胞）50 μ Lと混合した。37 $^{\circ}$ Cで24時間培養した後、細胞内のルシフェラーゼ活性を測定した。

[0058] 各血清型SRIPsに対するデング抗体陽性血清（#1）のADE活性をFold enhancementで示した（図6）。D1-SRIPsを用いたADE活性の結果と同様に、K562細胞及びMyIc細胞共に、安定して高いFold enhancement（1000～100000倍）がみられた。本アッセイ条件では、細胞数はFold enhancementに大きな影響を与えなかった。

[0059] （実施例7）培養時間短縮実験（K562細胞およびMyIc細胞）

デング抗体陽性血清（#1）を1：500抗体希釈度に固定し、D1-SRIPs抗原希釈度を1：100、1：1000に設定して、さらに短い培養時間（30分～16時間）でK562またはMyIc細胞を用いたADE

試験を実施した。具体的には、96穴ポリリジンコートマイクロプレート内で1:500に希釈したデング抗体陽性血清(#1) 36 μ Lと各々等量のD1-SRIPs (1:100または1:1000希釈) 36 μ Lを混合して37°Cで2時間反応させた後、 1.3×10^4 個、 4.0×10^4 個のK562またはMyIc細胞(Fc γ 受容体発現細胞) 50 μ Lと混合した。37°Cで30分間、1時間、2時間、5時間、7時間、16時間培養した後、細胞内のルシフェラーゼ活性を測定した。

[0060] 図7Aはルシフェラーゼ活性を、図7Bはそこから計算されるFold enhancementを示す。培養時間が短くなるにつれて、検体(#1)有のルシフェラーゼ活性は減少し、2時間より短い培養時間(2h, 1h, 30min)のいずれも抗体(-)のControlと同程度の低値であった(Log₁₀3未満)(図7A)。Controlのルシフェラーゼ活性は、16時間で既にLog₁₀3未満であった。ルシフェラーゼ活性の減少とともにFold enhancementも減少し、5時間未満の培養時間では「Log₁₀1=10倍」を下回るようであった(図7B)。また、抗原濃度を低下させるとルシフェラーゼ活性に大きく影響を与えたが、Fold enhancementへの影響は比較的小さかったことより、Fold enhancementは抗原濃度に大きく左右されずに評価の指標として用いられることが示唆された。

[0061] (実施例8) 高濃度SRIP抗原を用いた短時間培養—感染増強試験の至適条件の検討

デング抗体陽性血清(#1)を1:500抗体希釈度に固定し、D1-SRIPs抗原希釈度を1:2および1:10に設定して、5時間培養でMyIcおよびK562細胞を用いてADE試験を実施した。具体的には、96穴ポリリジンコートマイクロプレート内で1:500に希釈したデング抗体陽性血清(#1) 36 μ Lと等量のD1-SRIPs (1:2または1:10希釈) 36 μ Lを混合して37°Cで2時間反応させた後、 $6.9 \times 10^1 \sim 1.5 \times 10^5$ 個のMyIc細胞およびK562(Fc γ 受容体発現細胞)

50 μ L と混合した。37℃で5時間培養した後、細胞内のルシフェラーゼ活性を測定した。

[0062] 図8は5時間培養後の各細胞内のルシフェラーゼ活性から得られた Fold enhancement を示す。SRIP 抗原濃度と Fold enhancement は反比例の関係にあった。さらに、MyIc細胞は、K562細胞よりも、幅広い範囲の細胞数でADE活性の測定が可能であることが示唆された（ 5.6×10^3 個がピーク）。一方、K562細胞では細胞数に比例して Fold enhancement が増加傾向にあった。以上のことより、MyIc細胞はK562細胞よりも少ない細胞数条件下でアッセイの実施が可能であることが示唆された。

[0063] （実施例9）低濃度SRIP抗原を用いた長時間培養－感染増強試験の至適条件の検討

デング抗体陽性血清（#1）を1：500抗体希釈度に固定し、D1-SRIPs 抗原希釈度を1：100および1：1000に設定して、48時間培養でMyIcおよびK562細胞を用いてADE試験を実施した。具体的には、96穴ポリリジンコートマイクロプレート内で1：500に希釈したデング抗体陽性血清（#1）36 μ L と等量のD1-SRIPs（1：10または1：1000希釈）36 μ L を混合して37℃で2時間反応させた後、 $6.9 \times 10^1 \sim 1.5 \times 10^5$ 個のMyIc細胞およびK562（Fc γ 受容体発現細胞）50 μ L と混合した。37℃で48時間培養した後、細胞内のルシフェラーゼ活性を測定した。

[0064] 図9は48時間培養後の各細胞内のルシフェラーゼ活性から得られた Fold enhancement を示す。MyIc細胞は、感染時の細胞数が多過ぎると、却って Fold enhancement が低下することが示唆された（ 5.6×10^3 個がピーク）。一方、K562細胞では細胞数に比例して Fold enhancement が増加傾向にあった（D1-SRIPs を1：1000希釈で用いる時）。以上のことより、高い Fold enhancement を得るために、MyIc細胞を用いる際は、「 $5 \times$

10³個／ウェル」となるように、またK562細胞を用いる際は、「1×10⁵個／ウェル」となるように細胞を調製することが感染増強試験の至適条件であることが示唆された。

[0065] (実施例10) D1-SRIPs～D4-SRIPsを用いた Dengue 抗体陽性血清の濃度依存性感染増強活性の測定

Dengue 抗体陽性血清を階段希釈し、各D1-SRIPs～D4-SRIPs 抗原と反応させた後、MyIcおよびK562細胞に感染させてADE試験を実施した。以下の異なる2通りの条件でアッセイを行った。

(i) 96穴ポリリジンコートマイクロプレート内で1:10から4倍階段希釈した Dengue 抗体陽性血清 (#1 および #2) 36 μL と等量の D1-SRIPs～D4-SRIPs (1:10) 36 μL を混合して 37℃ で 2 時間反応させた後、5×10³個の MyIc 細胞および 1×10⁵個 K562 (Fcγ受容体発現細胞) 50 μL と混合した。37℃で5時間培養した後、細胞内のルシフェラーゼ活性を測定した。

(ii) 96穴ポリリジンコートマイクロプレート内で1:10から4倍階段希釈した Dengue 抗体陽性血清 (#1 および #2) 36 μL と等量の D1-SRIPs～D4-SRIPs (1:1000) 36 μL を混合して 37℃ で 2 時間反応させた後、5×10³個の MyIc 細胞および 1×10⁵個 K562細胞 (Fcγ受容体発現細胞) 50 μL と混合した。37℃で24時間培養した後、細胞内のルシフェラーゼ活性を測定した。

[0066] 図10は (i) 5時間または (ii) 24時間培養後の各細胞内のルシフェラーゼ活性から得られた Fold enhancement を示す。図10Aは各血清型の SRIPs に対する Dengue 抗体陽性血清 (#1) の濃度依存感染増強活性である。培養5時間後の濃度依存曲線は、MyIc細胞とK562細胞間で大きな波形の差は見られなかったが、24時間後の MyIc 細胞では D3-SRIPs に対する感染増強活性は、K562細胞の波形よりも低値を示した (血清希釈度 1:10～1:160)。同様に、図10Bは各血清型の SRIPs に対する Dengue 抗体陽性血清 (#2) の濃度依存感

染増強活性である。培養5時間後の濃度依存曲線は、MyIc細胞とK562細胞間で大きな波形の違いは見られなかったが、24時間後のMyIc細胞ではD3-SRIPsおよびD4-SRIPsに対する感染増強活性は、K562細胞の波形よりも低値を示した（血清希釈度1：10～1：160）。以上のことより、培養時間が24時間の場合は、一部のSRIPsに対する感染増強活性は、MyIc細胞とK562細胞間で異なることが示唆された。

産業上の利用可能性

[0067] 本発明のYFVレプリコンを有するSRIPsを用いることにより、従来よりも短期間で抗体の機能を判定することができることから、迅速な抗体試験を行うことができる。本出願は、日本で出願された特願2021-089309（出願日：2021年5月27日）を基礎としており、その内容はすべて本明細書に包含されるものとする。

請求の範囲

- [請求項1] 標識タンパク質をコードする領域及び黄熱ウイルスゲノムの非構造（NS）タンパク質1～5をコードする領域を有する遺伝子、ウイルスのキャプシドタンパク質、及び評価対象ウイルスの外殻タンパク質（Envelope）を有する1回感染性ウイルス粒子。
- [請求項2] 前記標識タンパク質をコードするが、前記1回感染性ウイルス粒子が感染した細胞内においてのみ発現可能である、請求項1に記載のウイルス粒子。
- [請求項3] 前記標識タンパク質がナノルシフェラーゼである、請求項1又は請求項2に記載のウイルス粒子。
- [請求項4] 評価対象ウイルスの外殻タンパク質がデングウイルスの外殻タンパク質である、請求項1～請求項3のいずれか1項に記載のウイルス粒子。
- [請求項5] CMVプロモーターが、前記標識タンパク質をコードする領域及び黄熱ウイルスゲノムの非構造（NS）タンパク質1～5をコードする領域の遺伝子の発現を直接制御するように、該領域の上流に連結している、請求項1～請求項4のいずれか1項に記載のウイルス粒子。
- [請求項6] 黄熱ウイルスゲノムの非構造（NS）タンパク質1～5をコードする領域及び標識タンパク質をコードする領域を有する遺伝子を有するベクター、ウイルスのキャプシドタンパク質をコードする遺伝子を有するベクター、及び評価対象ウイルスの外殻タンパク質をコードする遺伝子を有するベクターを動物細胞に感染させること、及び
感染細胞内で生成した請求項1～請求項5のいずれか1項に記載の1回感染性ウイルス粒子を回収すること、
を含む、請求項1～請求項5のいずれか1項に記載の1回感染性ウイルス粒子の製造方法。
- [請求項7] 前記ウイルスのキャプシドタンパク質をコードする遺伝子、及び／又は、評価対象ウイルスの外殻タンパク質をコードする遺伝子がC A

Gプロモーターにより直接制御されるように該CAGプロモーターと連結している、請求項6に記載の製造方法。

- [請求項8] 被検抗体の存在下で、Fc γ 受容体非発現細胞に請求項1～請求項5のいずれか1項に記載の1回感染性ウイルス粒子を接触させること、
- 、
- 前記細胞を24～48時間培養すること、及び
- 前記培養後の培養液中の標識を測定することを含む、
- 抗体の中和活性の判定方法であって、
- 測定された標識のレベルが陰性コントロール細胞において測定された標識のレベルよりも低い場合には、該被検抗体が前記評価対象ウイルスに対して中和活性を有すると判定される方法。
- [請求項9] 前記Fc γ 受容体非発現細胞がVer ϕ 細胞である、請求項8に記載の方法。
- [請求項10] 被検抗体の存在下で、Fc γ 受容体発現細胞に請求項1～請求項5のいずれか1項に記載の1回感染性ウイルス粒子を接触させること、
- 前記細胞を30分～24時間培養すること、及び
- 前記培養液中の標識を測定することを含む、
- 抗体の抗体依存性感染増強能の判定方法であって、
- 前記測定された標識のレベルが、陰性コントロール細胞において測定された標識のレベルよりも高い場合には、該被検抗体が前記評価対象ウイルスについて抗体依存性感染増強能を有すると判定される方法。
- 。
- [請求項11] 前記Fc γ 受容体発現細胞が、K562細胞又はMy ϕ 細胞である、請求項10に記載の方法。
- [請求項12] 前記Fc γ 受容体発現細胞が、2～16時間培養されることを特徴とする、請求項10又は請求項11に記載の方法。
- [請求項13] 1回感染性ウイルス粒子の希釈度が2倍以上である、請求項10～請求項12のいずれか1項に記載の方法。

- [請求項14] Fcγ受容体発現細胞の培養が、96ウェルプレート中、 2×10^5 細胞／ウェル以上のFcγ受容体発現細胞を用いて行われる、請求項10～請求項13のいずれか1項に記載の方法。
- [請求項15] 前記1回感染性ウイルス粒子の接触の前、あるいは、前記1回感染性ウイルス粒子の接触と同時に、被検抗体を含有する組成物が培養液に添加されることを含む、請求項10～請求項14のいずれか1項に記載の方法。
- [請求項16] 前記1回感染性ウイルス粒子と被検抗体を含有する組成物の混合物が培養液に添加される、請求項15に記載の方法。
- [請求項17] 前記被検抗体を含有する組成物が、被験者由来の血清である、請求項15又は請求項16に記載の方法。
- [請求項18] 前記被検抗体を含有する組成物が、 $10 \sim 10240$ 倍希釈された被験者由来の血清である、請求項17に記載の方法。
- [請求項19] 請求項1～請求項5のいずれか1項に記載の1回感染性ウイルス粒子を有効成分として含有する、抗体機能判定用組成物。
- [請求項20] 抗体機能が抗体依存性感染増強能又は中和活性である、請求項19に記載の抗体機能判定用組成物。
- [請求項21] 請求項6～請求項18のいずれか1項に記載の方法に使用するための、請求項19又は請求項20に記載の抗体機能判定用組成物。
- [請求項22] 請求項1～請求項5のいずれか1項に記載の1回感染性ウイルス粒子を有効成分として含有する、抗体機能判定用キット。
- [請求項23] 更に、陰性コントロール抗体又は標準抗体を含有する、請求項22に記載のキット。
- [請求項24] 更に、Fcγ受容体発現細胞を含有する、請求項22又は請求項23に記載のキット。