





図4 ハイドロキシアパタイトセラミックスクラムを用いたマウス感染  
脳10%乳剤の精製 -HA1-

# HA chromatography of JEV-infected mouse brain homogenate on HA-1 at 0.5 ml/min.

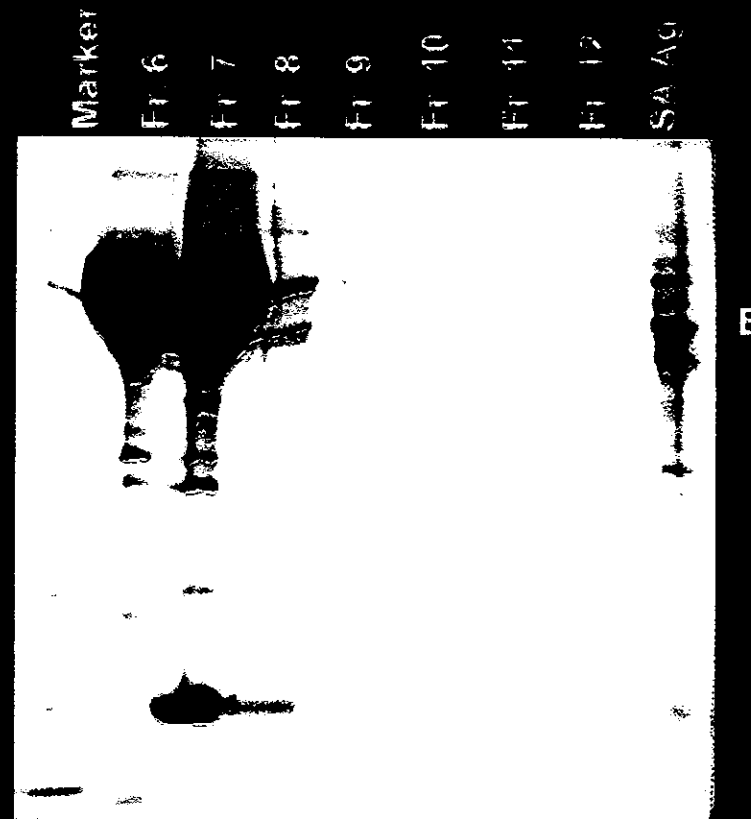
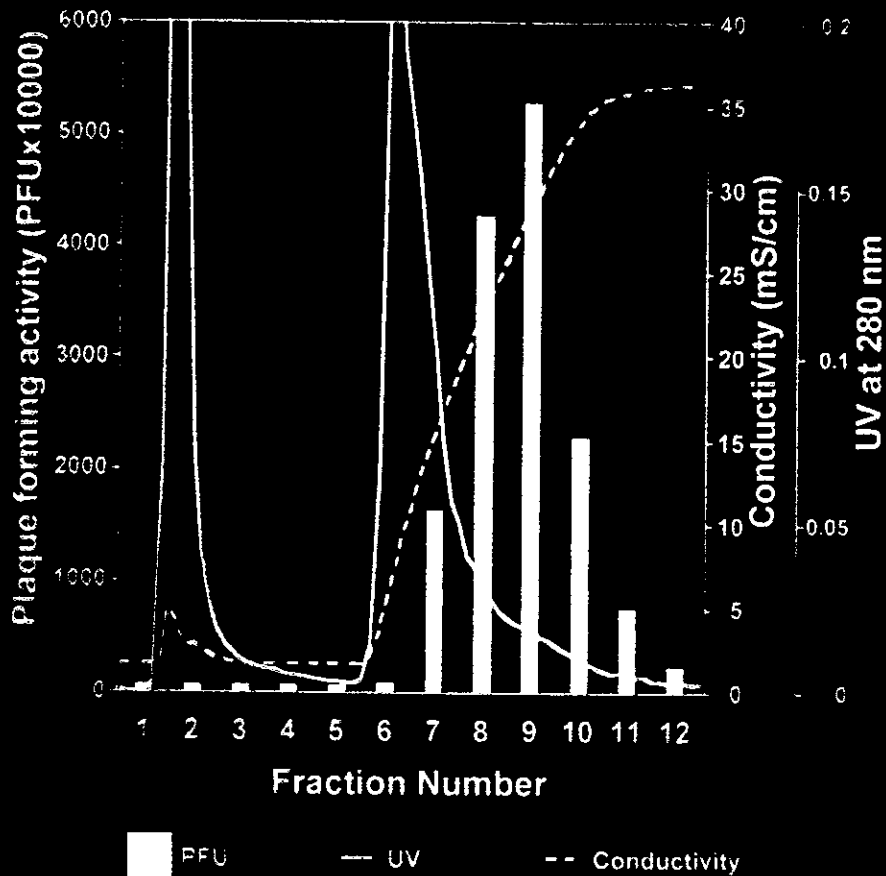
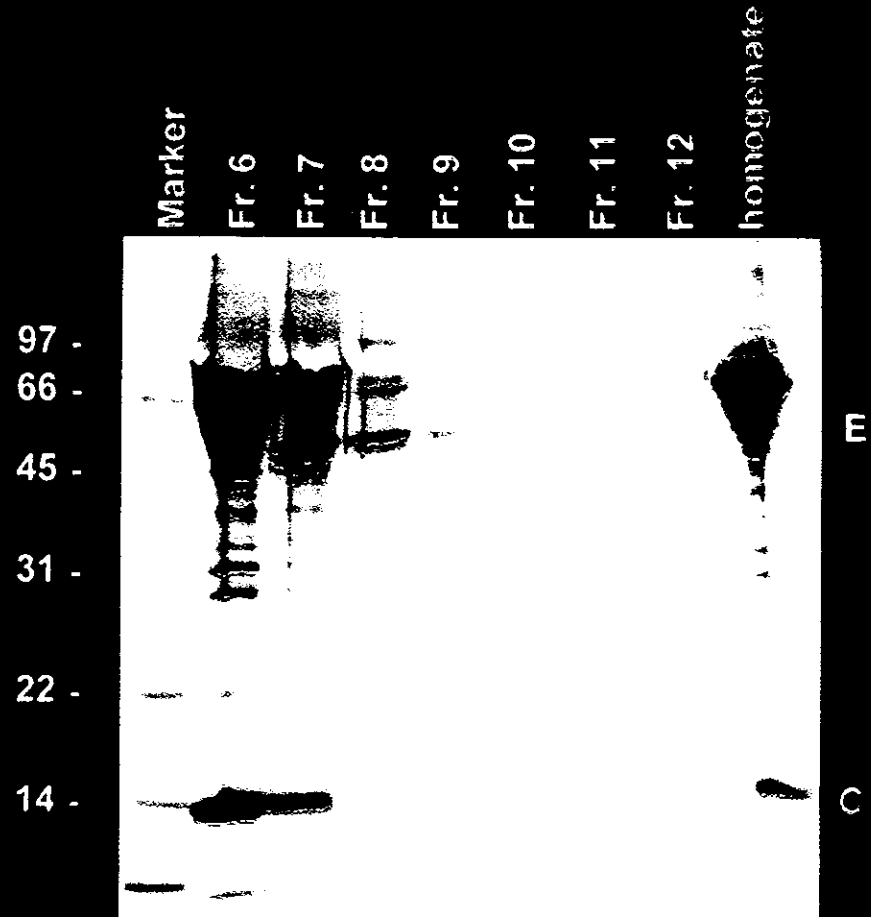
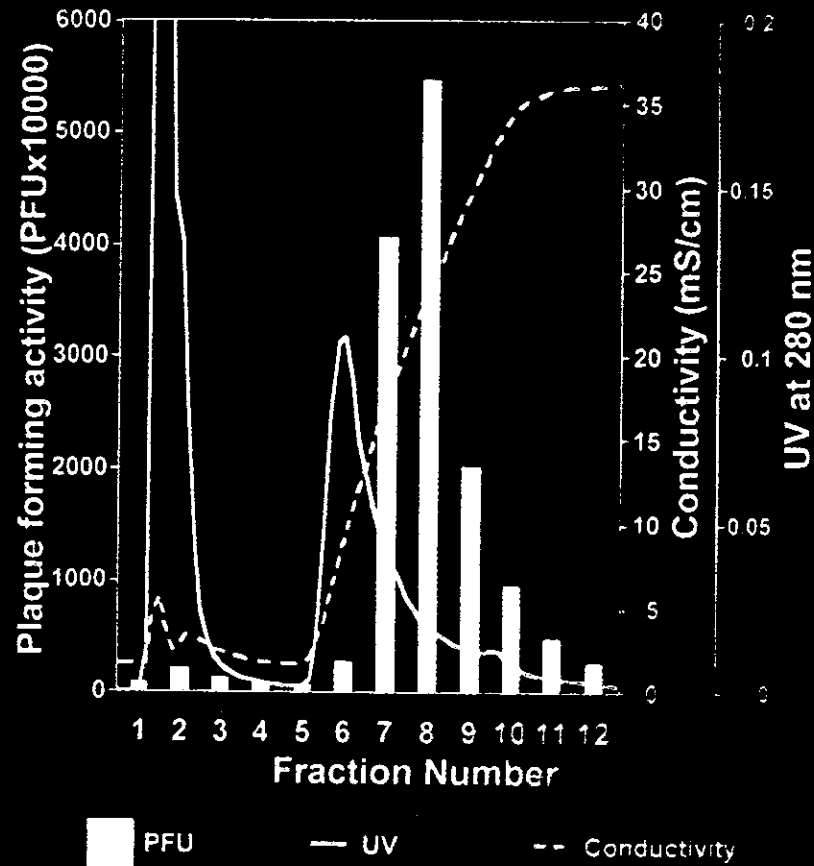


図5 ハイドロキシアパタイトセラミックスカラムを用いたマウス感染  
脳10%乳剤の精製 -HA3-

# HA chromatography of JEV-infected mouse brain homogenate on HA-III at 0.5 ml/min.



## 分担研究報告書

新しい日本脳炎ワクチンの開発：

日本脳炎ウイルスとデングウイルスのキメラを用いた病原性の解析

分担研究者 只野昌之（琉球大学医学部ウイルス学講座）

共同研究者 倉根一郎（国立感染症研究所ウイルス I 部）

五十嵐章（長崎大学熱帯病研究所分子構造解析分野）

C.J. Lai（米国 NIH, NIAID, LID）

研究要旨：デングウイルス遺伝子を背景に日本脳炎ウイルス遺伝子の外被膜蛋白領域を含むキメラウイルスの作製に成功した。5'側非翻訳領域(5'NCR)に 6 塩基の欠失を有する cDNA クローン(p2AJE[5'd+, ME])は欠失を持たないクローン(p2AJE[5'd-, ME])に比べて、それらから転写された RNA を導入した細胞から子孫ウイルスが産生されるまでの期間が延長された。単クローン抗体を用いた免疫染色と中和試験、および遺伝子の塩基配列の検討から両子孫ウイルスが想定したキメラであることが確認された。両キメラウイルスの蚊由来細胞(C6/36)における増殖は親ウイルスより低かった。サル腎由来細胞(Vero)における増殖は 32°C の条件では増殖するのに対して、37°C では増殖が制限されていた。また、37°C のインキュベーションで両キメラウイルスは親ウイルスに比べて安定性が低かった。さらに、両キメラウイルスの 1 日齢マウスの脳内接種実験で、p2AJE[5'd-, ME]から得られたキメラは親の日本脳炎ウイルスに匹敵する毒性を有するが、p2AJE[5'd+, ME]はデングウイルスのそれに近かった。一方、1 日齢マウスに対する腹腔内接種では何れのキメラウイルスも病原性が認められなかった。これらのことから、キメラウイルス遺伝子の 5'NCR の 6 塩基欠失は培養細胞におけるウイルスの増殖とマウス脳神経毒性に影響し、日本脳炎ウイルスの脳神経侵襲性には外被膜蛋白領域に加えて、それ以外の遺伝子領域が必要であると示唆された。また、p2AJE[5'd+, ME]から得られたキメラウイルスの遺伝子塩基配列の部分的な解析により、5'NCR の 6 塩基欠失の直後に 1 塩基の置換と、prM および E 蛋白領域に 3 つのアミノ酸置換を生じる塩基置換が認められた。これらの変異を幾つかの組み合わせで含む cDNA を再構築し、遺伝子導入細胞から子孫ウイルスが産生されるまでの期間を検討したところ、5'NCR にみられた 1 塩基の置換が同領域の 6 塩基欠失のウイルスへの影響を打

ち消していることを示唆する結果を得た。37°Cの条件で Vero 細胞における継代を繰り返すことで、37°Cでも親ウイルスと同等の熱安定性を有し、Vero 細胞で増殖可能なバリエーションを得た。マウス接種実験において、このバリエーションは脳内接種で哺乳マウスに致死感染を起こさず、もとのキメラウイルスよりも更に弱毒化されていた。

#### A. 研究目的

日本脳炎ウイルスはヒト、ブタ、ウマ、ウシ、鳥類など多くの動物種に感染し、ヒトとウマには重篤な脳炎を起こす。ブタへの感染ではウイルス血症を起こすが、脳炎は起こさない。また、ブタは生後約 6 カ月で食用に供されるためにターンオーバーが早く、抗体を持たない個体が次々に生産され続ける。これらのことから、ブタは日本脳炎ウイルスの重要な増幅動物として位置づけられる。また、本ウイルスに感受性の高いコガタアカイエカはブタの血液を好んで吸血することから主なベクターとして考えられている。水田はコガタアカイエカの恰好の生息場所であり、その様な場所には養豚場も多いことから、ブタとコガタアカイエカの間で効率の良い感染環が形成される。このように、本ウイルスの生態から考えて、米を主食とし、豚肉を蛋白源とするような食文化と日本脳炎流行の間には密接な関係があることがうかがえる。このような理由のためか、我が国と類似の食文化を持つ東および東南アジアは本症の流行地となっている。宗教的な理由で豚肉を摂取しない地域でも本症の流行がみられるのは輸出用にブタの飼育を行

っているためとみられる。最近ではマレーシアの回教徒が居住する地域における本症の大流行が報道されている。さらに、最近ではウォーレスラインを超えた地域でも本症の流行がみられ、オーストラリア本土に本ウイルスが上陸したという報告もある。このように、本症の流行は世界的に拡大する傾向にあり、新興・再興感染症の中でも重要な疾患となっている。特に、発展途上国では経済発展に伴い、食糧増産のための水田の拡大と蛋白源としてのブタの飼育が盛んに行われるようになる。このことは、日本脳炎の大流行を惹き起こす原因ともなる。かつて我が国においても本症が猛威を振るっていた時期があり、予防ワクチンの開発と普及が叫ばれていた。現在では症例数の減少に伴い、それらも縮小傾向にあるようだ。しかし、既述のごとく、世界的にみれば本症の予防ワクチンは依然必要性が高い。現行ワクチンは我が国が開発した優秀な不活化ワクチンと中国の生ワクチンに大別されるが、効果、コスト、安全性において未だ開発の余地がある。本ウイルスが分類されるフラビウイルス科の研究では次世代ワクチンとして、遺伝子工学的に発現させたコン

ポーネントワクチン、組換えワクチン、あるいは組換えアルファウイルス、他のフラビウイルスとのキメラ、DNA および RNA ワクチンなど、多くの方向で検討が進められている。本研究では、日本脳炎ウイルスと脳炎を起こさないデングウイルスとの間で作製されたキメラウイルスの性状を解析し、日本脳炎ウイルスの脳神経毒性あるいは脳神経侵襲性等の病原性に関わるウイルス側の要因を明らかにすると共に、新たな弱毒化の方法を見いだすことを目的とした。このような分子発病病理学的な側面から得られる知見はこれからのワクチン開発の一助となると期待される。

#### B. 研究方法

ウイルス、培養細胞、cDNA クローン、抗体：日本脳炎の死亡例から分離された日本脳炎ウイルス (JaOH0566 株、長崎大学・熱帯医学研究所・分子構造解析分野より分与) は C6/36 細胞で一度増幅させて実験に供した。四つの血清型のデングウイルスはプロトタイプウイルス (継代歴不明) を C6/36 細胞か哺乳動物脳で増殖させて実験に用いた。五十嵐によってクローニングされたヒトスジシマカ由来細胞 (C6/36) は 1mM 非必須アミノ酸および 10% ウシ胎児血清を含むイーグル MEM で 28°C の条件で培養した。サル腎由来細胞 (Vero) は 10% ウシ胎児血清を含むイーグル MEM で 37°C の条件で培養した。日本脳炎ウイルス

(JaOH0566 株) 遺伝子の cDNA クローン (pM147、長崎大学・熱帯病研究所・分子構造解析分野より分与) とデング 4 型ウイルス遺伝子の cDNA クローン (p2AXho、米国 NIH の Lai 博士より分与) は大腸菌で増殖して実験に用いた。日本脳炎ウイルスあるいはデング 4 型ウイルスの E 蛋白および各非構造蛋白に対する単クローン抗体は自作あるいは ATCC に登録されているものを用いた。

キメラウイルスの作製：pM147 を鋳型として PCR 法で日本脳炎ウイルス外被膜蛋白 (prM および E 蛋白) 領域 cDNA を調製した。この PCR 産物を p2AXho の相同領域と置換し、5'NCR に 6 塩基の欠失 (T76-A81) を含むもの (p2AJE[5'd+,ME]) と、それを含まないもの (p2AJE[5'd-,ME]) を作製した。それぞれのクローンから転写された RNA をデングおよび日本脳炎ウイルスに感受性のあるヒトスジシマカ由来細胞 (C6/36) にカチオンリポソーム存在下で導入した。日本脳炎ウイルスあるいはデングウイルスに特異的な単クローン抗体を用いた免疫染色で RNA 導入細胞から回収された子孫ウイルスを同定した。回収されたキメラウイルスの遺伝子塩基配列解析は目的領域 (5'末端付近から E 蛋白領域下流まで) を RT-PCR 法で増幅し、T/A クローニング (Invitrogene 社) した後にダイターミネイティング法 (ABI 社) で塩基配列を解析した。

マウス接種実験：1日齢の ICR マウスをキメラウイルスの病原性解析に用いた。C6/36 細胞で増殖した各キメラウイルスを 2%FBS を含むイーグル MEM で5ないし 10 倍階段希釈し、マウスの脳内(ic,25  $\mu$  l/mouse)あるいは腹腔内(ip,100  $\mu$  l/mouse)に1希釈当たり 1 腹(10-12mice)ずつ接種した。接種後、死亡の有無を 28 日間観察し、Reed-Muench 法で 50%致死量(LD50)を計算した。

### C. 研究結果

キメラウイルスの回収と同定：

5'非翻訳領域(5'NCR)に 6 塩基の欠失を持つ p2AJE[5'd+, ME]およびインタクトな p2AJE[5'd-,ME]から転写された RNA を導入した C6/36 細胞の培養液中に感染性子孫ウイルスを検出した。両子孫ウイルスは各々 v2AJE[5'd+, ME]、およびv2AJE[5'd-,ME]と命名した。単クローン抗体を用いた免疫染色で、両子孫ウイルスに感染した C6/36 細胞には日本脳炎ウイルス由来の prM および E 蛋白とデングウイルス由来のコア蛋白が産生されているが、デングウイルス由来の E 蛋白および日本脳炎ウイルス由来の非構造蛋白は産生されていないことが確認された(data not shown)。また、中和単クローン抗体を用いた中和試験で両ウイルスが日本脳炎ウイルスの中和エピトープを保有することも確認できた(data not shown)。これらのことから、回収された子孫

ウイルスはいずれもキメラウイルスであることが考えられた。転写 RNA の細胞内導入からウイルス産生までの期間は p2AJE[5'd+,ME]が 5 週間だったのに対して、p2AJE[5'd-,ME]では1週間であった。このことから、5'NCR の 6 塩基欠失がウイルス産生を制限していることが考えられた。しかし、v2AJE[5'd+,ME]の増殖特性を C6/36 細胞で検討すると、親ウイルスに比べて幾分遅れはみられるものの、正常な増殖曲線が得られた(図 1 a)。したがって、細胞への RNA 導入からウイルス産生までの期間に、ウイルスとしての増殖を可能にする変異が生じたと考えられた。そこで、ウイルス遺伝子の 5'末端付近から E 蛋白領域の 3'末端付近の塩基配列を検討したところ、5'NCR の欠失の直後に一塩基の置換と prM 蛋白領域に 1 アミノ酸置換および E 蛋白領域に 2 アミノ酸置換を生じさせる塩基置換が認められた(表 1)。これらの変異の何れかが 5'NCR の 6 塩基欠失の影響に拮抗していることが考えられた。さらに、この塩基配列の検討においても子孫ウイルス遺伝子が、もとの組換え DNA と同様にキメラ状になっていることが確認できた。

培養細胞における増殖特性と熱安定性の検討：

哺乳動物細胞 (Vero) および昆虫細胞 (C6/36) におけるキメラウイルスの増殖を検討した。図 1 a にみられるように、昆虫細胞ではキメラウ



ウイルスは両方の親ウイルスより低い増殖能を示した。また Vero 細胞では 37°C の条件ではキメラウイルスは殆ど増殖しなかった。ところが、32°C の条件では Vero 細胞でも増殖した。これらのことから、Vero 細胞における増殖の制限は細胞向性によるものではなく、培養温度に影響されていると考えられた。そこで、2%FBS を含む MEM で希釈したキメラウイルス、および両方の親ウイルス（日本脳炎およびデングウイルス）を 37°C あるいは 28°C で 4 時間インキュベートした後、各々感染価の減少を測定した。37°C のインキュベーションでは 0°C でインキュベートした場合に比べて 2 つの親ウイルスの感染価は約 10 分の 1 しか減少しなかったが、キメラの感染価は約 660 分の 1 に減少した（図 2 a）。また、C6/36 細胞の培養温度である 28°C におけるインキュベーションでは両親ウイルスおよびキメラウイルスは数分の 1 の感染価減少で差がみられなかった（図 2 b）。これらのことから、キメラウイルスは親ウイルスに比べて熱安定性が低く、そのことが増殖に影響していると考えられた。

Vero 細胞を用いて 37°C の条件で 2 週間毎に 10 回継代したキメラについて、温度安定性、培養細胞における増殖特性、免疫染色で観察されるフォーカスの形状を測定した。Vero 細胞で継代したキメラの 37°C における熱安定性(data not shown)は親ウイルスと同じで、もとのキメラに比べて、

フォーカスの形状も大きかった(data not shown)。また、Vero 細胞における増殖特性は 28°C、32°C、および 37°C の何れの条件でも差はみられなかった（図 1 c）。この熱安定性バリエーションの遺伝子の 5'NCR から E 蛋白領域までの塩基配列を検討したところ、幾つかの新たな変異がみられた（表 1）。

マウスに対する病原性および免疫原性の検討：

C6/36 細胞で増殖したキメラウイルス v2AJE[d+,ME] および

v2AJE[d-,ME] の哺乳 ICR マウス（1 日齢）に対する脳神経毒性および脳神経侵襲性を脳内(ic)接種と腹腔内(ip)接種で検討した。ic 接種実験では表 2 に見られるように、v2AJE[d+,ME] はデングウイルスに近い病原性がみられたが、

v2AJE[d-,ME] は日本脳炎ウイルスに近い病原性が認められた。ip 接種では何れのキメラウイルスも最高濃度のウイルスを接種してもマウスを死に至らしめることは出来なかった。これらのことから、マウスの脳内に直接接種したときの病原性、すなわち脳神経毒性には日本脳炎ウイルスの外被膜蛋白 (prM および E 蛋白) が強く関与するが、末梢部からの感染で脳炎を惹き起こす脳神経侵襲性には外被膜領域に加えて、他の領域の関与が必要であることが明らかとなった。また、5'NCR の 6 塩基欠失はマウス脳神経毒性に強く影響する

ことがわかった。さらに熱安定性バリエーションの ic 接種におけるマウス病原性 (表 2) は比較したどのウイルスより低かった。このことから、このバリエーションの遺伝子に生じた何れかの変異が強力な弱毒化に関与しているものと思われる。

キメラウイルスの再構築:

v2AJE[d+, ME] 遺伝子の 5'NCR および prM-E 領域に認められた変異を幾つかの組み合わせで含むようなキメラウイルスを再構築し (図 3)、それらから転写された RNA を C6/36 細胞に導入して、一週間後の子孫ウイルス産生を確認した。prM あるいは E 蛋白領域の変異だけでは子孫ウイルスが産生されず、全ての変異を含む再構築体のみが子孫ウイルスを産生できることが確認された。後者の結果から、全ての変異がウイルスの感染性に必要であることがうかがえるが、前二者の結果を考慮に入れると 5'NCR の 6 塩基欠失の直後の塩基置換が重要であると思われる。

#### D. 考察

フラビウイルス科に分類されるウイルスの間では米国 NIH のグループが初めてキメラ作成に成功した。最近では黄熱ウイルス遺伝子を背景としたキメラウイルスの作製が報告され、我々の日本脳炎ウイルスとデングウイルスのキメラ作成はそれらに次ぐものである。

本研究で作製されたキメラウイル

スは 5'NCR の欠失(T76-A81)の有無に関わらず、28°C (C6/36) と 32°C (Vero) の条件では増殖できたのに対して、37°C (Vero) では増殖が制限されていたことから、キメラが温度感受性になっていることが示唆された。キメラウイルスの遺伝子に何らかの変異が加わったことが考えられるが、5'NCR に 6 塩基欠失を持たないキメラには遺伝子上に変異が認められないにも関わらず、温度感受性の形質を有していた。このことから、遺伝子の組換え操作の過程で生じたと推定される E 蛋白領域の変異(Leu472->Arg)が温度感受性に関与している可能性が考えられた。現在、472 番目のアミノ酸を本来のロイシンに戻し、この変異の影響を検討しているところである。いずれにしても、v2A[5'd-,ME] のマウス接種実験結果から、この変異はマウス脳神経毒性に影響していないことは明らかである。この温度感受性に関しては 37°C の培養条件でも感染 Vero 細胞中にウイルス特異抗原が発現していることや、ウイルス液の感染価が 37°C のインキュベーションで激減したことから、感染細胞におけるウイルス遺伝子の複製や蛋白合成より、むしろウイルス粒子の形態形成や放出の過程で温度の影響を受けていると推測された。温度の影響が細胞への吸着に影響している事も考えられるので、細胞へのウイルス粒子の吸着の測定などの詳しい検討が必要と思われる。

ウエスタンプロティングによる

検討(data not shown)で、キメラ由来の prM および E 蛋白の移動が日本脳炎ウイルス由来のものとは一致しなかった。このことについてはキメラウイルス遺伝子のプロテアーゼ活性を有する NS3 および ns2b 蛋白領域がデングウイルス由来であるためにポリプロテインのクリベージサイトがずれているか、糖鎖の付加が異なることなどが考えられるので、さらに詳しい解析が必要と思われる。

v2AJE[5'd+, ME]の遺伝子にみられた幾つかの変異を組み合わせキメラを再構築した実験で、5'NCR の塩基置換(G86->C)が同領域の6塩基欠失の影響を打ち消していると思われる結果を得た。フラビウスの5'側および3'側にある非翻訳領域の生物学的活性については未だ推測の域をでないが、この研究で得られた結果からは少なくとも5'NCRはウイルスの *viability* とマウス脳神経毒性に重要な働きをしていることがうかがえた。

キメラウイルスが日本脳炎ウイルスと比較して脳神経侵襲性を欠いていたのは脳神経侵襲性を持たないデングウイルスとのキメラ化による結果と考えられた。哺乳マウスの脳内へ接種した実験で v2A[5'd-,ME]は日本脳炎ウイルスに近い病原性を有していたが、腹腔内接種では全くマウスを殺すことができなかった。このことから、脳神経侵襲性には日本脳炎ウイルスの外被膜蛋白領域に加えて、それ以外の領域の関与が必要で

あると考えられた。JaOH0566 株を弱毒化して得られた豚免疫用弱毒生ワクチン株 ML17 の塩基配列の検討から prM、ns4b および NS5 の領域にアミノ酸置換が確認されている。これらのことから JaOH0566 株の脳神経毒性には prM の領域か、ns4b および NS5 のいずれか、あるいは両方が脳神経侵襲性に重要であると推測されるので、外殻蛋白以外の領域で組み換えたキメラによる検討を計画している。

## E. 結論

デングウイルス遺伝子を背景に日本脳炎ウイルス遺伝子の外被膜蛋白領域を有する二つのキメラを作製した。これらのキメラのマウス病原性の検討から、5'非翻訳領域の6塩基欠失(dT76-A81)がウイルスの弱毒化に働くことがわかった。また、この欠失を有するキメラの温度安定性バリエーションには更に弱毒化を誘導する変異が存在していると思われる。日本脳炎ウイルスの末梢部から脳への脳神経侵襲性には外被膜蛋白に加えて、他の領域の関与が必要であることがわかった。その領域を明らかにすることは本ウイルスの発病病理に新知見を与えるだけでなく、治療法あるいはワクチンの開発にとって重要である。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

Lai C.J., Bray M., Men R., Cahour

A., Chen W., Kawano H., Tadano M., Hiramatsu K., Tokimatsu I., Pletnev A., Arakaki S., Shameem G. and Rinaudo M.: Evaluation of Molecular Strategies to Develop a Live Dengue Vaccine.

## 2. 学会発表

Makino Y., Tadano M., Matsuo S., Hasebe F., Fukunaga. and Lai C.J.: Characterization of a Chimera Constructed Between Japanese Encephalitis Virus and Dengue Type 4 virus. IVth International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses. (1997)

牧野芳大、只野昌之、松尾幸子、馬紹平、長谷部太、五十嵐章、福永利彦：DEN4/JEV キメラウイルスの作成とその性状。第45回日本ウイルス学会総会 (1997)

Tadano M., Makino Y., Ma S-P., Yamashiro T., Hasebe F., Lai C.J., Igarashi A. and Fukunaga T.:

Construction and Characterization of Chimeric Japanese Encephalitis / Dengue Type 4 Virus. The Thirty-second Joint Working Conference on Viral Diseases. US-Japan Cooperatives Medical Science Program. (1998).

只野昌之、馬紹平、山城哲、加根村和美、牧野芳大、長谷部太、五十嵐章、福永利彦：日本脳炎ウイルス／デング4型ウイルスキメラの性状に関する検討。第46回日本ウイルス学会総会(1998)

馬紹平、只野昌之、山城哲、牧野芳大、長谷部太、五十嵐章、福永利彦：JEV/DEN4 キメラウイルスの塩基配列の検討。第46回日本ウイルス学会総会(1998)

只野昌之：デングウイルス4型と日本脳炎ウイルスのキメラ作成、および生物学的性状。シンポジウム「デング熱／デング出血熱を巡って」第39回日本熱帯医学会総会(1998)

表1

Differences in nucleotide and amino acid sequences between 2AJE[5'd+,ME] and its heat-stable variant

	Parent	JE/DEN4 chimera	Variant
		2AJE[5'd+,ME]	2AJE[5'd+,ME]hs
5' NCR (DEN4)	T <sub>76</sub> -A <sub>81</sub>	del <sup>†</sup>	del <sup>†</sup>
	G <sub>86</sub>	C	C
	C <sub>94</sub>	C	T
prM (JE)	Phe <sub>133</sub>	L	F
	Ile <sub>152</sub>	I	I
	Ala <sub>292</sub>	A	V
E (JE)	Glu <sub>307</sub>	E	K
	Gly <sub>434</sub>	G	S
	Leu <sub>472</sub>	R <sup>§</sup>	R <sup>§</sup>
	Ala <sub>660</sub>	A	V
	His <sub>689</sub>	L	H

<sup>†</sup> § 組換えDNAに含まれていた変異

表2

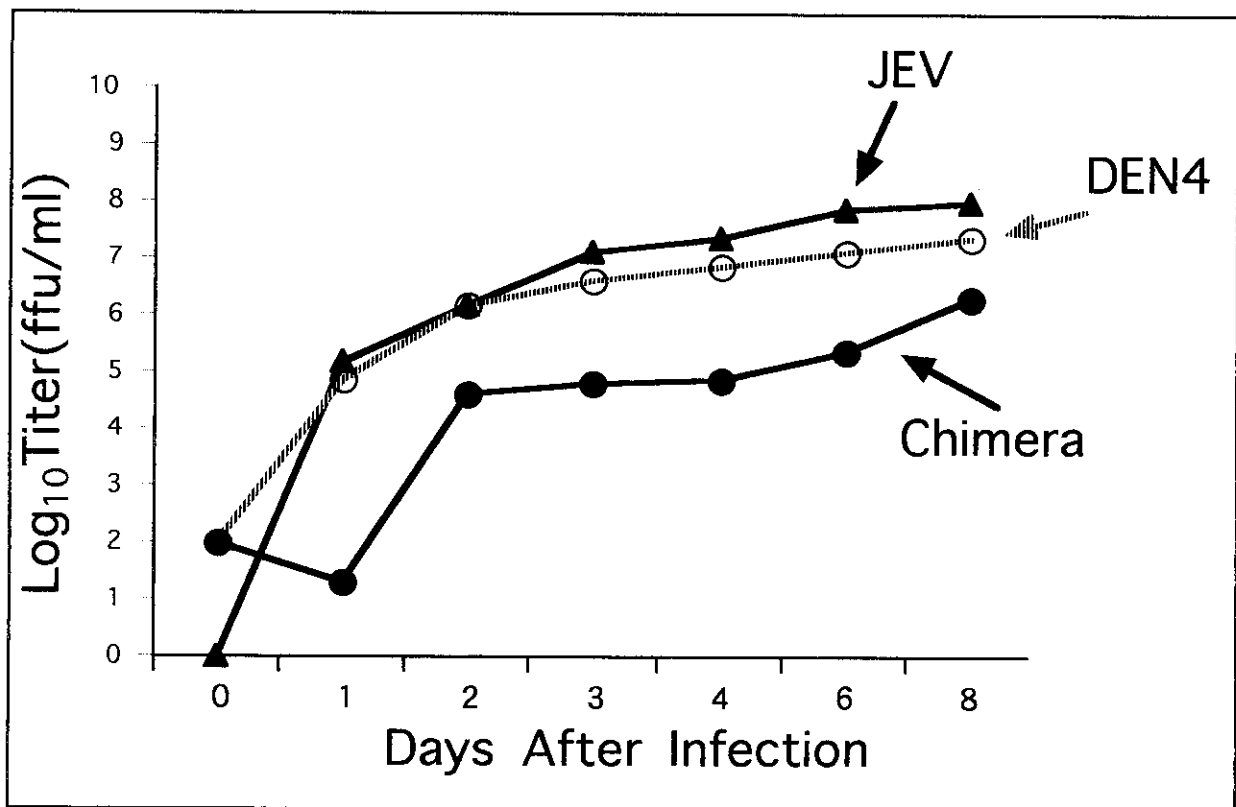
Pathogenicity of JEV/DEN4 chimera viruses  
in suckling mice

Virus	LD <sub>50</sub> (ffu <sup>§</sup> /mouse)	
	ic <sup>†</sup>	ip <sup>¶</sup>
v2AJE[d+,ME]	30	>250 <sup>‡</sup>
v2AJE[d-,ME]	0.02	>4.25 <sup>‡</sup>
v2AJE[d+,ME]hs <sup>*</sup>	>100 <sup>‡</sup>	>100 <sup>‡</sup>
JEV(JaOH0566)	0.1	0.1
DEN4(v2AXho)	≤10	>2500 <sup>‡</sup>

<sup>\*</sup>熱安定性バリエント、<sup>§</sup> focus forming unit、<sup>†</sup>脳内、<sup>¶</sup>腹腔内、<sup>‡</sup>最高濃度を接種

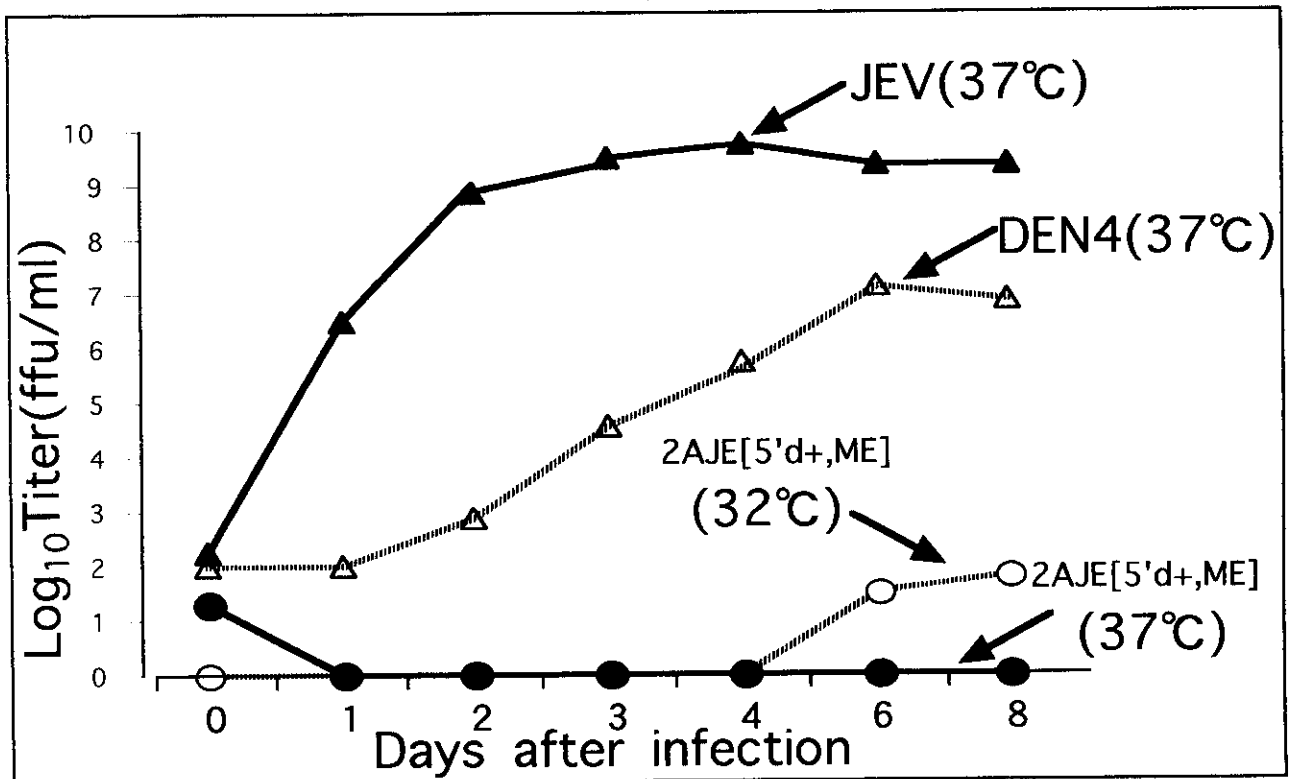
1a

## Growth properties of JEV/DEN4 chimera and parent viruses in C6/36 cells



1b

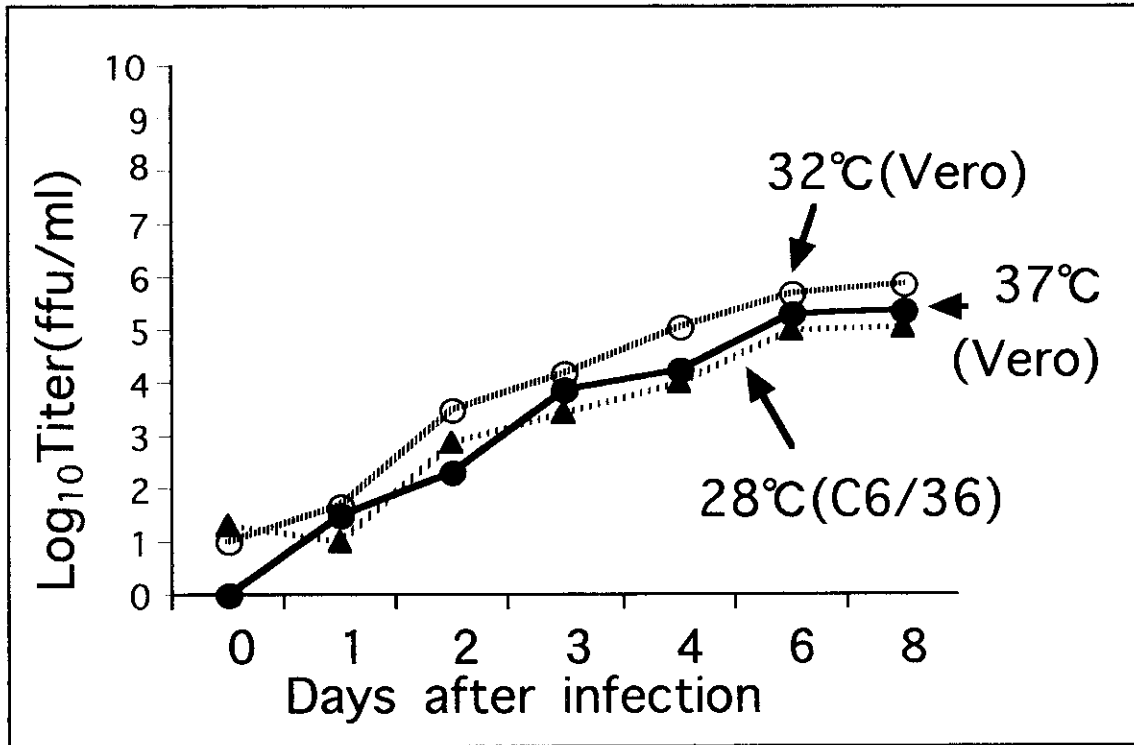
## Growth properties of JEV/DEN4 chimera and parent viruses in Vero cells





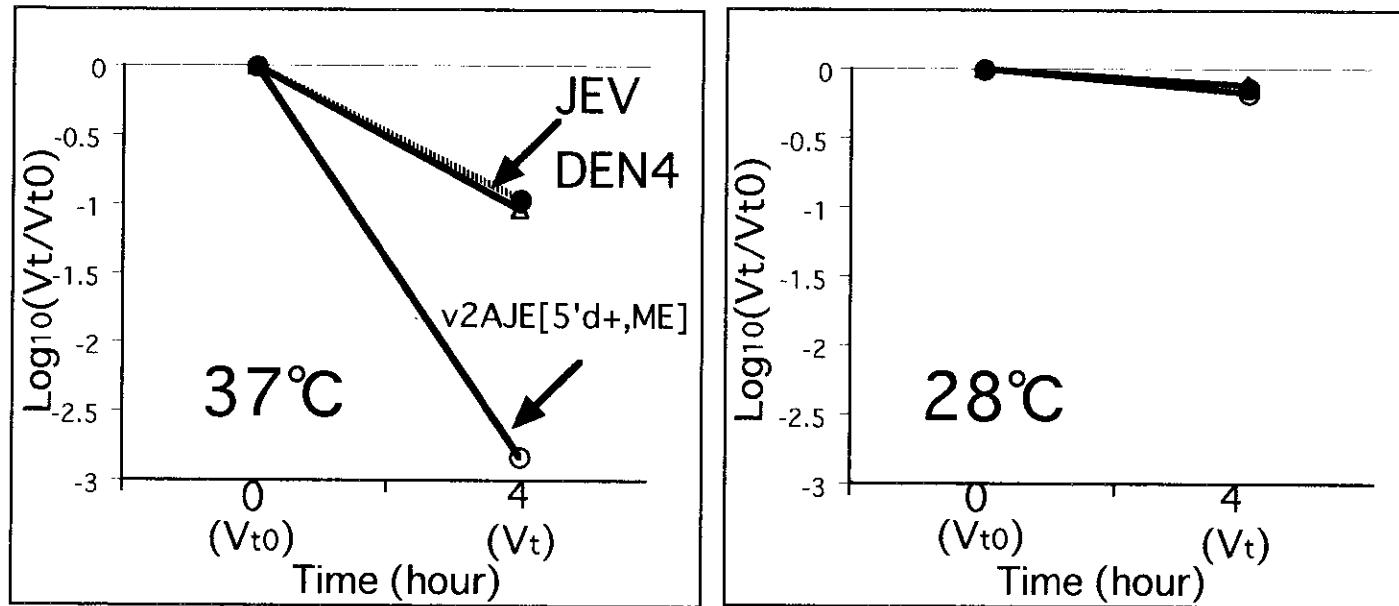
1c

## Growth properties of heat-stable v2AJE[5'd+,ME] in Vero and C6/36



2a,b

## Heat-lability of parental and chimeric viruses in different temperature

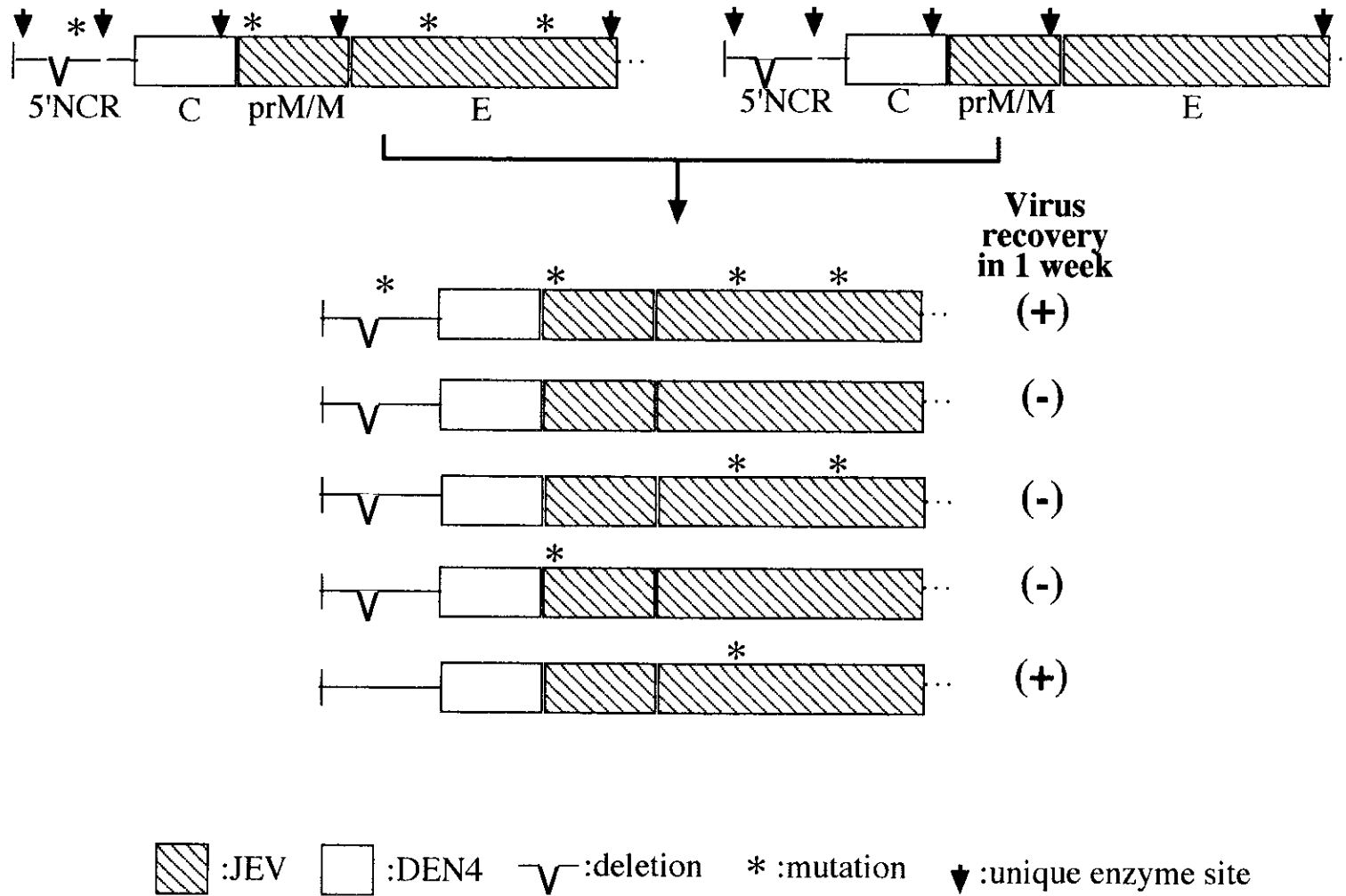


a

b

图3

### Construction of mutant JE/DEN4 cDNA clones and their viability



## デングウイルス持続感染ヒト B 細胞株感染機構の超微形態学的解析

分担研究者 高崎智彦(国立感染症研究所ウイルス第 1 部)

共同研究者 高田和男(近畿大学医学部神経内科学教室)

倉根一郎(国立感染症研究所ウイルス第 1 部)

デングウイルスは、一般に生体内では持続感染を生じないと考えられている。しかしながら、デングウイルスは *in vitro* で EBV-transformed human lymphoblastoid cell line に感染し、持続感染状態になることが、すでに倉根らにより報告されている。今回我々は、透過型電子顕微鏡を用いてデングウイルス持続感染 Raji 細胞の感染機構を解析した。その結果、デングウイルス持続感染 Raji 細胞では、その多くの細胞ではウイルス粒子を認めず、少数の細胞では極めて少量のウイルス産生を来すが、細胞を障害する程ではなく、おそらく感染細胞がウイルス粒子を有したまま、あるいはウイルス粒子は有しない状態で 2 分裂しながら、95%以上の持続感染(蛍光抗体法により観察結果)を維持していることが示唆された。

### A. 研究目的

デングウイルスは *in vitro* で EBV-transformed human lymphoblastoid cell line に感染し、持続感染状態になることが、すでに倉根らにより報告されている。今回我々は、透過型電子顕微鏡を用いてデングウイルス持続感染 Raji 細胞の感染機構を解析した。

### B. 研究方法

倉根らが樹立したデングウイルス 2 型 (DEN2) 持続感染 Raji 細胞を用いた。比較検討のため DEN2 を moi.5 で感染させた 6 日目の Raji 細胞および DEN2 感染 C6/36 細胞(感染後 6 日目)を用い透過型電子顕微鏡により観察した。

試料作製法は、各細胞を遠心しペレットを作り、2%グルタルアルデヒド 2 時

間でその後 1%オスミウム酸にて固定後、常法どおりエタノール系列で脱水しプロピレンオキシドに置換、エポキシ樹脂に包埋後、超薄切片を作製し透過型電子顕微鏡(日立 H-7100)にて観察した。

### C. 研究結果

間接蛍光抗体法にてデングウイルス抗原陽性細胞が 95%である持続感染 Raji 細胞では、電顕観察により形態は比較的保持されており、細胞質内の "smooth membrane structures(SMSs)" に少数のウイルス粒子を認めた。また少数の細胞破砕物様構造も存在したが、そこには急性感染 C6/36 細胞によく認められる明らかなウイルス粒子を伴った SMSs の集積した所見は認められなかった。また、Raji 細胞では、デングウイルス粒子を持つ細