

中和の両方が陽性だった血清の各々の抗体価から最小自乗法(method of least square)で計算される回帰直線の式がそれぞれの図に記入されている。沖縄本島住民血清の中和抗体価の散布図から得られる回帰直線の傾き(0.3984)は石垣島のそれ(0.2128)より大きかった。

D. 考察

不活化 JE ワクチンで能動免疫されたマウスは脳内、腹腔内いずれの接種ルートからの WNV の攻撃に対しても防御された。これまでのところ、日本における WNV の存在は知られていない。従って、WNV 常在地への渡航歴のない我が国住民の保有する JEV 中和抗体は JE ワクチン接種か JEV の自然感染によって産生されたと考えられる。本研究では WNV 常在地への渡航歴がない日本人由来の高力価 JE 抗体含有ヒトガンマグロブリンで受動免疫されたマウス群についても WNV を脳内接種してヒトの WNV 抗体でも防御可能か否かを検討した。その結果、ワクチン免疫と遜色ない防御が確認された。このことから、ヒトにおいても JE に対する免疫が WNV 感染に対しても防御に働くことが示唆された。現在、WNV に対する有効なワクチンが無く、WNV 感染症の対策は媒介蚊の駆除など間接的な手段しかない。本研究では、現行 JE ワクチンによるマウス能動免疫が WNV の致命的な脳内接種に対して防御可能なことが確

認され、ヒト由来の JE 抗体によるマウスへの受動免疫でも、致命的 WNV 脳内接種からマウスを防御できることを確認できた。これらのことから、現行 JE ワクチンが JEV のみならず WNV 感染症の予防にも用いることができると示唆された。

JEV の侵淫度が高いと考えられる沖縄本島と JEV の活動が殆ど無いと考えられる石垣島に居住する住民から得られた血清について、WNV と JEV に対する中和試験を行った結果、沖縄本島住民血清の 96.2%が沖縄本島で分離された JEV を中和し、そのうち 54.7%が WNV を中和し、何れのレートも石垣島の住民のそれらより高かった。この結果は、両島に居住する住民が保有している JEV に対する免疫の質的なちがいを示していると解釈される。これまでの調査でも明らかなように、沖縄本島住民はワクチン接種に加えて JEV の自然感染でも抗原刺激を受けているが、石垣島住民の JEV に対する免疫は、殆どワクチンによる抗原刺激で誘導されたと考えられる。このような免疫の質的なちがいが、WNV 交叉中和抗体陽性率の差に現れたのではないと思われる。このことを明らかにするには石垣島のように JEV が殆ど循環していないような地域に居住する住民や沖縄本島のような JEV 高侵淫地域住民、および JE 患者の WNV 交叉中和抗体を測定するなどの詳細な調査が必要である。沖縄本島住民血清の WNV 交叉中

和抗体陽性率の年齢階層による解析で、51歳以上の住民は JEV 中和抗体陽性率が 100%であったのに対して、WNV 交叉中和抗体陽性率が 20%と低かった。米国ニューヨークにおける WNV 脳炎が高齢層に好発していた事実から考えて、JEV 高侵淫地域に WNV が侵入した場合でも高齢者への予防対策は重要であると考えられた。

E. 結論

マウスを用いた実験で、日本脳炎 (JE) ワクチンによる免疫および JE 抗体を含むヒト血清の硫安分画による受動免疫は致死的な西ナイルウイルス (WNV) 接種からマウスをプロテクトした。このことから、現行 JE ワクチンは JEV のみならず WNV にも有効であると考えられた。

JEV の侵淫度が異なる二つの地域に居住する住民の WNV 交叉中和抗体を調査した。JEV の自然感染による抗原刺激を受けていないと思われる住民の WNV 交叉中和抗体保有率は JEV 侵淫度の高い地域に居住する住民に比べて有意に低く、JE ワクチン接種で WNV に対する防御を期待するにはより頻回のワクチン接種が必要と考えられた。また、JEV 侵淫度が高い地域でも 51 歳以上の高齢層では JE 抗体保有率は非常に高いにもかかわらず WNV 交叉中和抗体保有率は低かった。このことから、JEV 侵淫度が高い地域でも高齢者への JE ワクチンの追加接種が必要であると思われた。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

準備中

2. 学会発表

日本脳炎ワクチンで免疫したマウスにおける西ナイルウイルス致死的感染に対する交叉防御、只野昌之、新川武、馬紹平、加根村和美、森田公一、倉根一郎、福永利彦、第 49 回日本ウイルス学会(2001)、抄録集 p173

沖縄県住民血清の西ナイルウイルスに対する交叉中和抗体測定、加根村和美、只野昌之、馬紹平、森田公一、倉根一郎、福永利彦、第 49 回日本ウイルス学会(2001)、抄録集 p174

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許

名称：「日本脳炎ワクチンによる免疫の西ナイルウイルス感染に対する交叉防御効果」、発明者：只野昌之(ほか8名)、科学技術振興事業団整理番号：U2001p155、国有特許(国内)

2. 実用新案登録および 3. その他

何れもなし

表 1. 日本人ボランティアの日本脳炎ウイルスおよび西ナイルウイルスに対する中和抗体価

被検血清	JEV(Beijing-1)	WNV(Eg101)
A	450	50
B	50	<10
C	50	12
D	100	20
E	50	<10
F	15	<10

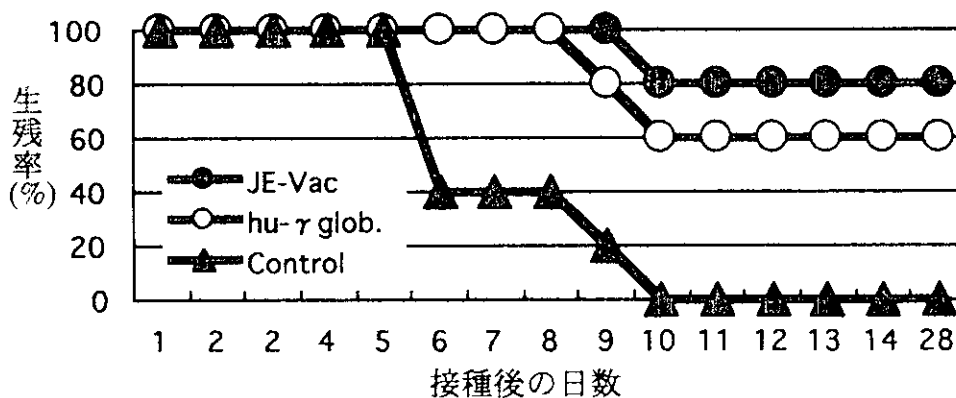


図 1. JE 免疫マウスの WNV 脳内チャレンジテスト

Mouse: ddy, Female, 5mice/group, Challenge virus: WNV(Eg101), 10LD₅₀, ic

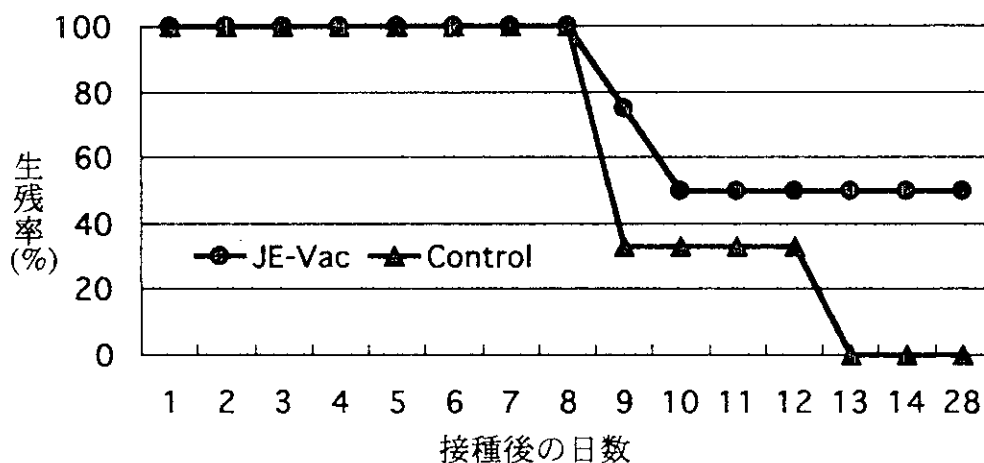


図 2. JE 免疫マウスの WNV 腹腔内チャレンジテスト

Mouse: ddy, female, 3 or 4 mice/group Challenge virus: WNV(Eg101), 200LD₅₀, ip

表 2. 沖縄県住民の JE 中和抗体および WNV 交叉中和抗体保有率

		WNV (Eg101)			
		+ ^c	- ^d		
沖縄本島	JEV (C307 ^e)	+	82 ^a (52.6 ^b)	68 (43.6)	150 (96.2)
		-	0 (0.0)	6 (3.8)	6 (3.8)
			82 (52.6)	74 (47.4)	156

		WNV (Eg101)			
		+	-		
石垣島	JEV (C307)	+	34 (18.5)	69 (37.5)	103
		-	0 (0.0)	81 (44.0)	81
			34 (18.5)	150 (81.5)	184

a: 献体数, b: %, c: 中和抗体陽性, d: 中和抗体陰性, e: 沖縄分離株

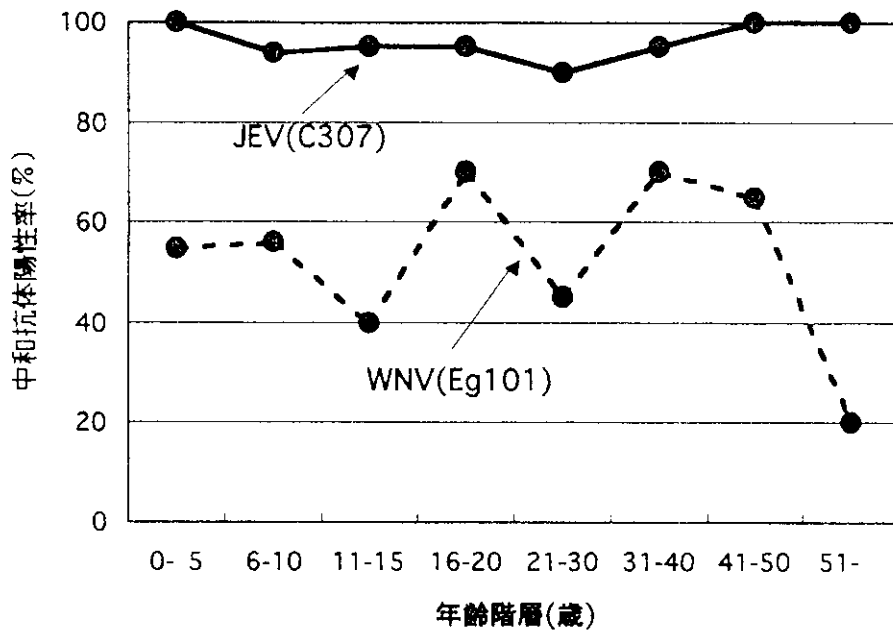


図 3. 沖縄本島住民の JEV 中和抗体および WNV 交叉中和抗体保有率(年齢階層別)

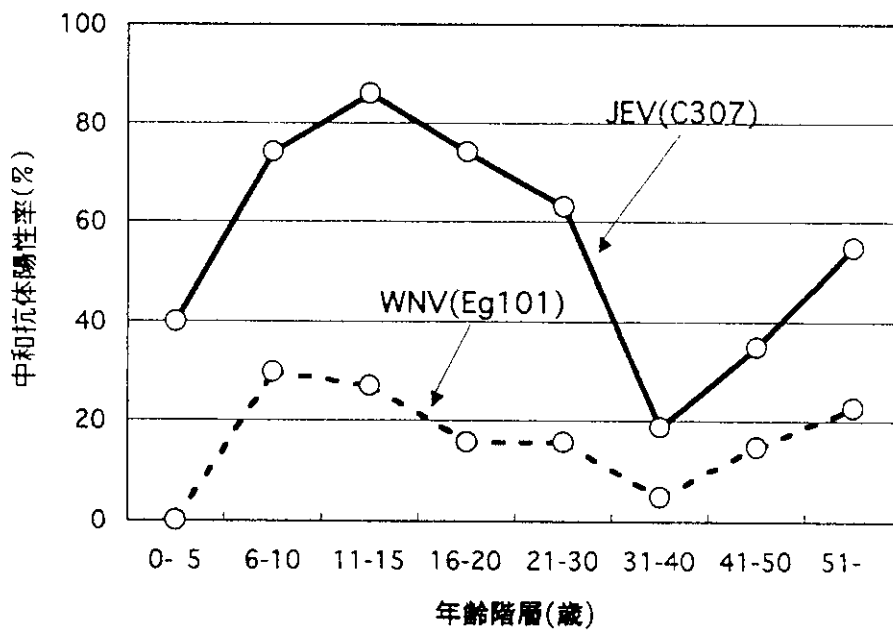


図 4. 石垣島住民の JEV 中和抗体および WNV 交叉中和抗体保有率(年齢階層別)

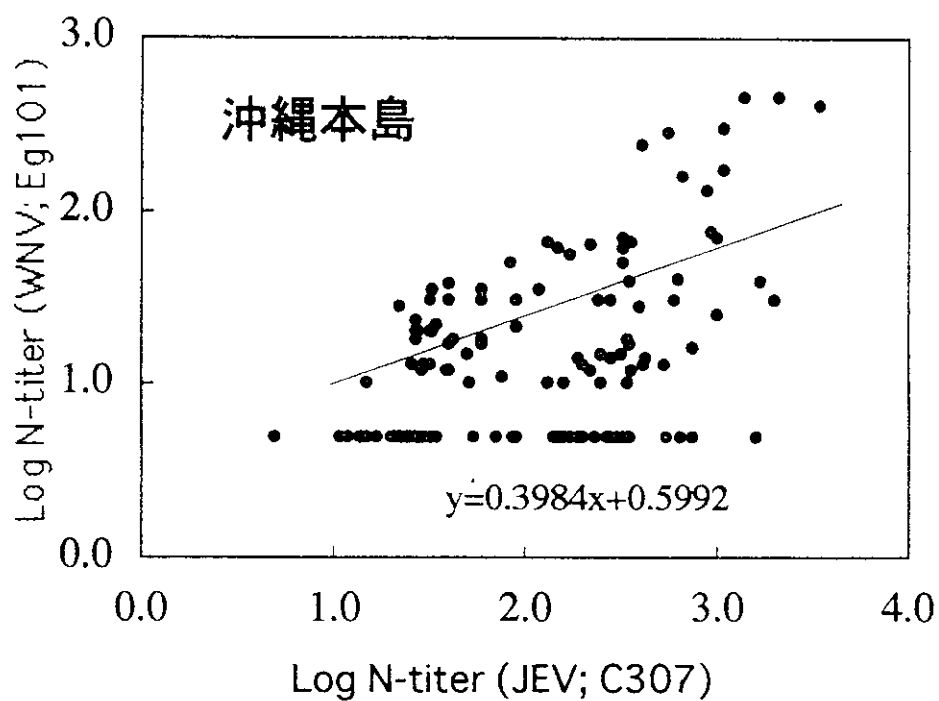


図 5. Correlation between N antibody titers against WNV and JEV

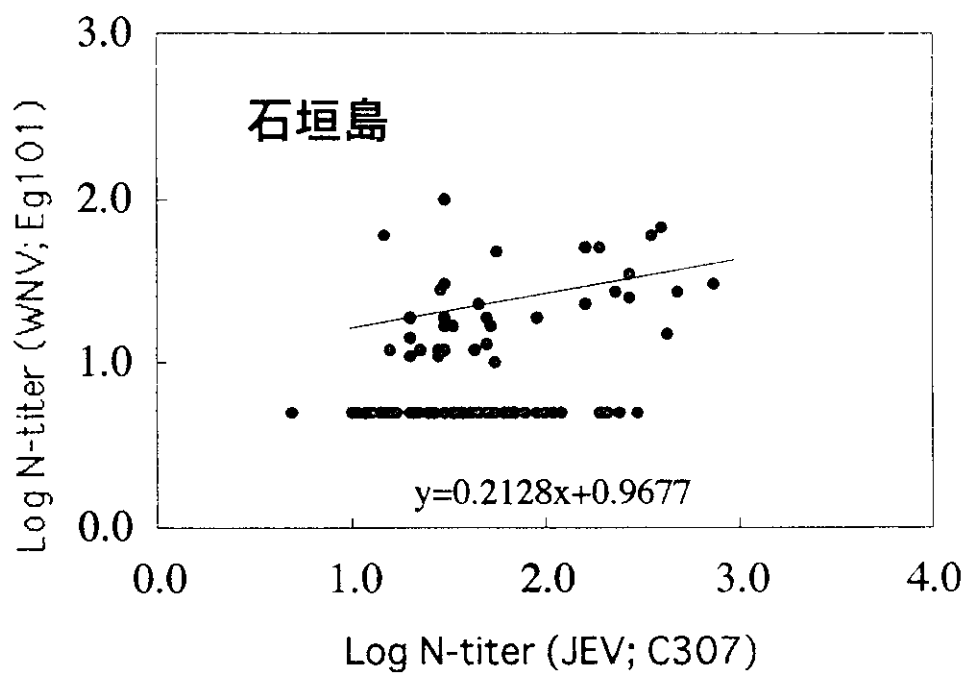


図 6. Correlation between N antibody titers against WNV and JEV

分担研究報告書

西ナイルウイルスに対する日本脳炎不活化ワクチンの効果

分担研究者 高崎智彦(国立感染症研究所)

協力研究者 矢部貞雄、根路銘令子、倉根一郎（国立感染症研究所）

研究要旨

昨年、8月にニューヨークでヒト、鳥類、馬において流行した西ナイルウイルス脳炎の原因ウイルスは、日本脳炎ウイルスとその抗原性が極めて類似している。両ウイルス間には抗体の交叉反応があり、日本脳炎患者血清は、西ナイルウイルスを中和する。従って、現行の日本脳炎不活化ワクチンが西ナイルウイルス感染あるいは、脳炎発症を予防するか否かを、マウスを用いて検討した。その結果、ウイルスを脳内接種した場合は、有意な効果を認めず、腹腔接種した場合は、ある程度の効果は認めしたが、十分な防御効果は示さなかった。

A. 研究目的

一般にフラビウイルス属のウイルス間では抗体の交叉反応がある。1999年から2001年の夏にニューヨークで流行し、合衆国東部に拡がっている西ナイル脳炎の原因ウイルスである西ナイルウイルス(WNV)は、日本脳炎ウイルスとその抗原性が極めて類似している。そのため日本脳炎患者血清が、西ナイルウイルスを中和する。そこで現行日本脳炎不活化ワクチンが西ナイル脳炎の発症を防御するかについてマウスを用いて検討した。

B. 研究方法

生後4週令のBALB/cマウス(メス)に現行日本脳炎不活化ワクチン(北京株)を原液・4倍・8倍・16倍・32倍希釈し0.5ccを腹腔内接種により免疫、一週間後同量を追加免疫した。各希釈段階ともにマウスは10匹を用いた。攻撃用ウイルスは西ナイルウイルスを用い、2回目免疫の一週間後に100LD₅₀および10LD₅₀になるウイルス量を脳内接種した。この時、同時にLD₅₀を確認するために非免疫マウスに10倍、50倍、100倍、500倍、1000倍希釈したWNVを各群

10匹同様の方法で脳内接種した。すなわち攻撃ウイルス量を同週令・同ロットのマウスを用いて測定し、マウスの週令およびロットによる変動をモニターした。また、西ナイルウイルスを腹腔接種(4週令時に一回のみ)したマウスを陽性コントロールとし、同様に脳内接種した。なお抗体測定用に接種前日に各マウスの眼静脈より採血した。脳内接種後、経日的にマウスを観察した。

また、腹腔接種群でも同様に、生後4週令のBALB/cマウスに現行日本脳炎不活化ワクチン(北京株)を原液・16倍し0.5ccを腹腔内接種により免疫、一週間後同量を追加免疫した。この時の攻撃ウイルス量は10LD₅₀を用いた。

C. 研究結果

脳内接種後3日目ないし4日目には、マウスは発病し、すべての希釈段階で8日目には死亡した。これは、日本脳炎ワクチンを接種しなかった群と差が無かった。ただし、32倍免疫群は日本脳炎ワクチンを接種しなかった群および他の群より約一日早く麻痺および死亡にいたった。WNV接種群は、有意にWNV脳内接種後の脳炎発症に対し

て防御効果を示した。また、この結果は攻撃ウイルス量 100LD₅₀、10LD₅₀ 間にも有意な差はなく、同様の結果であった (表 1)。

腹腔接種群は、原液接種群および 16 倍接種群ともに 10 匹中 8 匹生き残った。この時のワクチン非接種群は 10 匹中 1 匹生き残った (表 2)。

また、ワクチン接種群の中和抗体価をブランク減少法により測定したところ、日本脳炎ウイルスに対しては、極めて高い中和抗体価を示したが、西ナイルウイルスに対しては、原液・4 倍接種群で 10 倍の中和抗体価を示すにとどまった (表 3)。

D. 考察

現行の日本脳炎不活化ワクチンの有効性判定には、国家検定でも以前は脳内接種法によるダイレクトチャレンジ法を用いていた。現在、ダイレクトチャレンジ法で有効性を判定しているワクチンとして狂犬病不活化ワクチンがある。狂犬病ワクチンでは 5 倍・25 倍希釈で免疫した場合、10 LD₅₀ から 100LD₅₀ のウイルス量で脳内接種して、十分な発症予防効果を示す。今回の結果から、腹腔攻撃に対してはある程度の防御効果を示したが、日本脳炎ワクチンを原液で接種取した群においても 2 匹死亡した。この結果は決して十分な防御効果を示したとはいえない。また、中和抗体の誘導に関しても、50%ブランク減少法で日本脳炎ウイルスに対して極めて高い中和抗体を誘導したが、西ナイルウイルスに対しては、ワクチン原液接種群でも 10 倍であった。以上の結果、日本脳炎ワクチンは西ナイルウイルスに対する有効性は高くないと考えられる。少なくとも西ナイルウイルスが中枢神経系に侵入した場合、脳炎発症防御効果は無いと結論される。

E. 研究発表

1. 論文発表

Tomohiko Takasaki, Masaru Nawa, Ken-Ichiro Yamada, Akira Takeda, Ichiro Kurane
Evaluation of dengue IgM detection tests using sera from patients with autoimmune diseases.
Journal of Virological Methods 102, 61-66. 2002

西ナイル脳炎ウイルスとは
高崎智彦. 感染症と化学療法 5(8) 39-42 (2001)

Ken-Ichiro Yamada, Tomohiko Takasaki, Masaru Nawa, Mikio Nakayama, Yoko T. Arai, Kinjiro Morimoto, Sadao Yabe, Ichiro Kurane. Demographic features of imported dengue fever cases serodiagnosed in Japan during 2000. Journal: Dengue Bulletin WHO. 24 42-45, 2001

Ken-Ichiro Yamada, Tomohiko Takasaki, Masaru Nawa, Ichiro Kurane Increase in the sensitivity of dengue diagnosis by combination of reverse transcriptase-polymerase chain reaction and passage on cell culture. The Southeast Asian journal of tropical medicine and public health. 3 470-471, 2001

Ken-Ichiro Yamada, Tomohiko Takasaki, Masaru Nawa, Ichiro Kurane. Virus isolation as one of the diagnostic methods for dengue virus infection. Journal of Clinical Virology 24(3):203-209

Itou M, Itou T, Sakai T, Santos MF, Arai YT, Takasaki T, Kurane I, Ito FH. Detection of rabies virus RNA isolated from several species of animals in Brazil by RT-PCR. Journal of Veterinary Medical Sciences 63(12): 1309-1313 (2001)

Mikako Ito, Yohko T. Arai, Takuya Ito, Sakai Takeo, Fumio H. Ito, Tomohiko Takasaki, Ichiro Kurane Genetic Characterization and geographical distribution of rabies virus isolated from Brazil: Identification of two reservoirs Virology. 284, 214-222 .2001

2. 学会発表

高崎智彦、根路銘令子、新井陽子、山田堅一郎、森本金次郎、中山幹男、倉根一郎
「日本脳炎ワクチンの西ナイル脳炎発症予防効果」第 49 回日本ウイルス学会 2001 年

11月

高崎智彦

「ニューヨークにおける西ナイル脳炎/今なにをすべきか」(第36回日本脳炎生態学研究会(石川県七尾市)2001年5月)

倉根一郎、高崎智彦:日本における節足動物媒介性ウイルス感染症の現状と問題点.
第70回日本衛生動物学会(山形) 2001年4月

表1. 日本脳炎現行不活化ワクチンによる免疫マウスに対する西ナイルウイルスの脳内チャレンジ試験

A. 攻撃ウイルス量50LD₅₀

ワクチン濃度	生存	死亡
4倍希釈	0	10
8倍希釈	0	10
16倍希釈	0	10
32倍希釈	0	10
コントロール	0	10
コントロール: no vaccination		
攻撃ウイルス量: 50LD ₅₀		

B. 攻撃ウイルス量5LD₅₀

ワクチン濃度	生存	死亡	総数
1倍希釈	2	8	10
4倍希釈	0	10	10
8倍希釈	0	10	10
16倍希釈	0	10	10
32倍希釈	0	10	10
コントロール	0	10	10
コントロール: no vaccination			
攻撃ウイルス量: 5LD ₅₀			

表2. 日本脳炎現行不活化ワクチンによる免疫マウスに
対する西ナイルウイルスの腹腔チャレンジ試験

ワクチン濃度	生存	死亡	総数
原液	8	2	10
16倍希釈	8	2	10
コントロール	1	9	10

コントロール: no vaccination

攻撃ウイルス量: 10LD₅₀

表3

日本脳炎不活化ワクチンによる免疫マウスの中和抗体価

	免疫濃度	JEV抗体価	WNV抗体価
日脳免疫マウス	1x	2560x	10x (65.2%)
	4x	>320x (63.3%)	10x (53.5%)
	8x	>320x (64.5%)	<10x
	16x	320x (51.6%)	<10x
	32x	80x (52.2%)	<10x
WNV免疫マウス	5x10 ⁵ PFU/0.5ml	<10x (45.9%)	160x (56.2%)

検査血清は、5xLD₅₀の実験に用いたマウスから採血したもので、各10匹を等量プールした血清であり、個体間では差があると考えられる。

厚生労働省科学研究費補助金（新興再興感染症研究事業）

分担研究報告書

ジフテリアトキシン A フラグメントを負荷した日本脳炎ウイルスと、
アフリカミドリザル腎由来 Vero 細胞との膜融合の観察

分担研究者 名和 優(埼玉医科大学微生物学教室)

共同研究者 高崎智彦(国立感染症研究所ウイルス 1 部)

山田堅一郎(国立感染症研究所ウイルス 1 部)

倉根一郎(国立感染症研究所ウイルス 1 部)

中西真人(大阪大学微生物病研究所)

島 康彦(大阪大学大学院)

後藤俊幸(大阪医科大学微生物学教室)

佐野浩一(大阪医科大学微生物学教室)

赤塚俊隆(埼玉医科大学微生物学教室)

研究要旨 日本脳炎ウイルス(JEV)の宿主細胞への感染初期過程を解析する目的で、アフリカミドリザル腎由来 Vero cell 表面に吸着したウイルスを弱酸性条件へ暴露し、ウイルスと細胞との膜融合を観察した。膜融合の観察は、超音波処理でジフテリアトキシン A フラグメント(DTA)を負荷し、紫外線照射で不活化した精製ウイルス粒子の細胞表面での膜融合による毒素分子の細胞内への直接侵入による細胞毒性の発現でおこなった。膜融合のモデルとしてセンダイウイルスおよび A 型インフルエンザウイルスへ同様の方法で毒素を導入し、比較観察した。DTA を負荷した JEV を吸着後細胞表面にて弱酸性条件に暴露した結果、ウイルス接種量に比例した細胞毒性が観察された。JEV による膜融合は、ウイルス中和活性を有するエンペローフ糖タンパク分子に対するモノクローナル抗体の前処理、およびウイルス粒子を架橋化試薬で処理後に抑制された。JEV による Vero cell 表面での膜融合は、細胞内の酸性小区画におけるウイルスと細胞の膜融合を反映すると考えられ、JEV の感染過程の解析に応用できた。

A. 研究目的

日本脳炎はアジアを中心として、近年ハブア・ニューギニアにまで流行範囲を拡大しつつある蚊媒介性フラビウイルスの日本脳炎ウイルスを

病原とする、公衆衛生上極めて重要な感染症である。日本脳炎は現行の不活化ウイルスワクチンの接種で感染防御可能な中和抗体を産生させることが可能であり、発生のコントロ

ールという目的は達成できているが、日本脳炎の発病メカニズム、特に JEV の感染機構、およびウイルス中和に関する基礎的理解は十分でない。

分担研究者の 1998 年までの研究により、JEV の脊椎動物由来 Vero cell および蚊由来 C6/36 cell への侵入は、宿主細胞のエンドサイトーシスに依存することが報告された。しかしながら、細胞内へ取り込まれた後、エンドソームなど酸性小区画内でのウイルスと細胞との膜融合によるウイルスアンコーティングは証明されていない。

本研究では、JEV の宿主細胞への感染機構を解析するため、細胞表面に吸着したウイルスと細胞膜との弱酸性条件における膜融合を観察する。

B. 研究方法

実験は、精製した JEV(JaGAR-01 株)を用いた。Vero cell との膜融合の観察は、ジフテリアトキシン A フラグメント(DTA)の細胞内への侵入による細胞毒性の発現でおこなった。ジフテリアトキシンは真核細胞のタンパク合成を強力に阻害し、細胞を死に至らしめる。DTA は細胞への吸着に関与する B フラグメントを欠くためそれ自体吸着できない。そこで、センダイウイルスで前例報告された超音波により JEV 粒子内へ DTA を負荷

し、UV 不活化したのち氷冷条件下で Vero cell 表面へ吸着させた。細胞表面へ吸着した JEV を短時間(37℃、15 分間)中性(pH 7.4)および酸性(pH 6.0)に暴露した。その後 37℃、5 日間培養し、成長した細胞コロニー数を計数し、細胞毒性を観察した。

膜融合のモデルとして、センダイウイルス(Z 株)および A 型インフルエンザウイルス(A/Aichi/2/68)を发育鶏卵で増殖させ、精製した後同様の方法で DTA を負荷した。DTA による特異的細胞死と非特異的細胞死を識別する目的で、ジフテリアトキシン耐性チャイニーズハムスター細胞由来 cDNA(pg HED7-A)を導入して形質転換したジフテリアトキシン耐性の Vero cell line (Vero-DT^r)を新たに確立して用いた。

この他、Vero cell 表面に吸着した JEV の pH 6.0 での融合を電子顕微鏡で観察した。また、JEV の膜融合がウイルスエンベローフ糖(E)タンパクの関与する反応であることを観察する目的で、JEV、E タンパクに対するモノクローナル抗体(#503)、および架橋化試薬(dimethylsuberimidate, DMS)を用いた。

(倫理面への配慮)

本研究は全て試験管内での反応の観察に終始するため、バイオセーフ

ティーの基準に配慮した他、特別な倫理面での配慮の必要はなかった。

C. 研究結果

1) 始めに、膜融合活性について解析の進んでいるセンダイウイルス、および A 型インフルエンザウイルスを用いて観察した。DTA を負荷されたウイルスを Vero cell に吸着後、センダイウイルスでは中性条件(pH 7.4)で、A 型インフルエンザウイルスでは酸性条件(pH 5.3)でそれぞれウイルス接種量に比例した細胞毒性が観察された。(図 1A および B)

2) JEV での反応を観察した。超音波処理法で、加えた DTA の 0.22 % (0.28 $\mu\text{g/ml}$)の活性がウイルス粒子内に検出され、これは 7.7×10^4 分子/PFU に相当した。このような条件で Vero cell へ吸着後酸性条件に暴露した結果、ウイルス接種量に比例した細胞毒性が観察された。(図 1C および D)

3) ウイルス粒子内でなく、反応溶液中の遊離の DTA による細胞毒性を観察した。センダイウイルスでは未処理ウイルスを細胞に吸着後 37°C 15 分後に反応溶液中に加えた DTA による細胞毒性が観察されたが、JEV では観察されなかった。(図 1E)

4) JEV, E タンパクエピトープに対するモノクローナル抗体#503 および #504 (Kimura-Kuroda and Yasui, J. Gen.

Virol., 67: 2663-2672, 1986)で前処理したウイルスの膜融合活性を観察した。JEV 中和活性を示す#503 は細胞毒性の発現を抑制した(84.4 %の抑制)。中和活性を示さない#504 は細胞毒性の発現を抑制しなかった。(表)

5) JEV へ DTA を負荷後 DMS で架橋化すると、細胞毒性の発現が抑制された。

D. 考察

DTA を負荷するために 6 分間の超音波処理で JEV の感染価は 1/10 に低下したが、血球凝集活性は 1/2 の低下であった。JEV の Vero cell への吸着は血球凝集活性と相関する (Butrapet et al. Am. J. Trop. Med. Hyg., 58: 389-398, 1998)ので、DTA 負荷 JEV は Vero cell へ吸着したと考えられた。

中性および酸性条件で膜融合の報告されているセンダイウイルスおよび A 型インフルエンザウイルスでの観察結果と照らし合わせて、JEV が pH 6.0 で Vero cell 表面で膜融合したことが示唆された。

JEV を中和するモノクローナル抗体#503 による膜融合の抑制は、膜融合に E タンパクが直接関係することを示した。pH 7 以下に暴露された JEV の E タンパクエピトープの反応性が変化したことは分担研究者によってすでに報告されている (Microbiol. Immunol. 40: 365-371, 1996)。

実験結果より、酸性条件において JEV E タンパク分子に構造変化が生じ、細胞の膜と融合したと考えられた。

E. 結論

JEV の宿主細胞への感染は、細胞内へ取り込まれた後、エンドソームなどの酸性小区画内の酸性環境に暴露されたウイルス粒子と細胞の膜融合によりウイルス遺伝子が細胞質へ移動する。そして、膜融合を阻止する抗体はウイルス中和活性を示した。

F. 健康危険情報

特記すべきことなし。

G. 研究発表

発表準備中

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

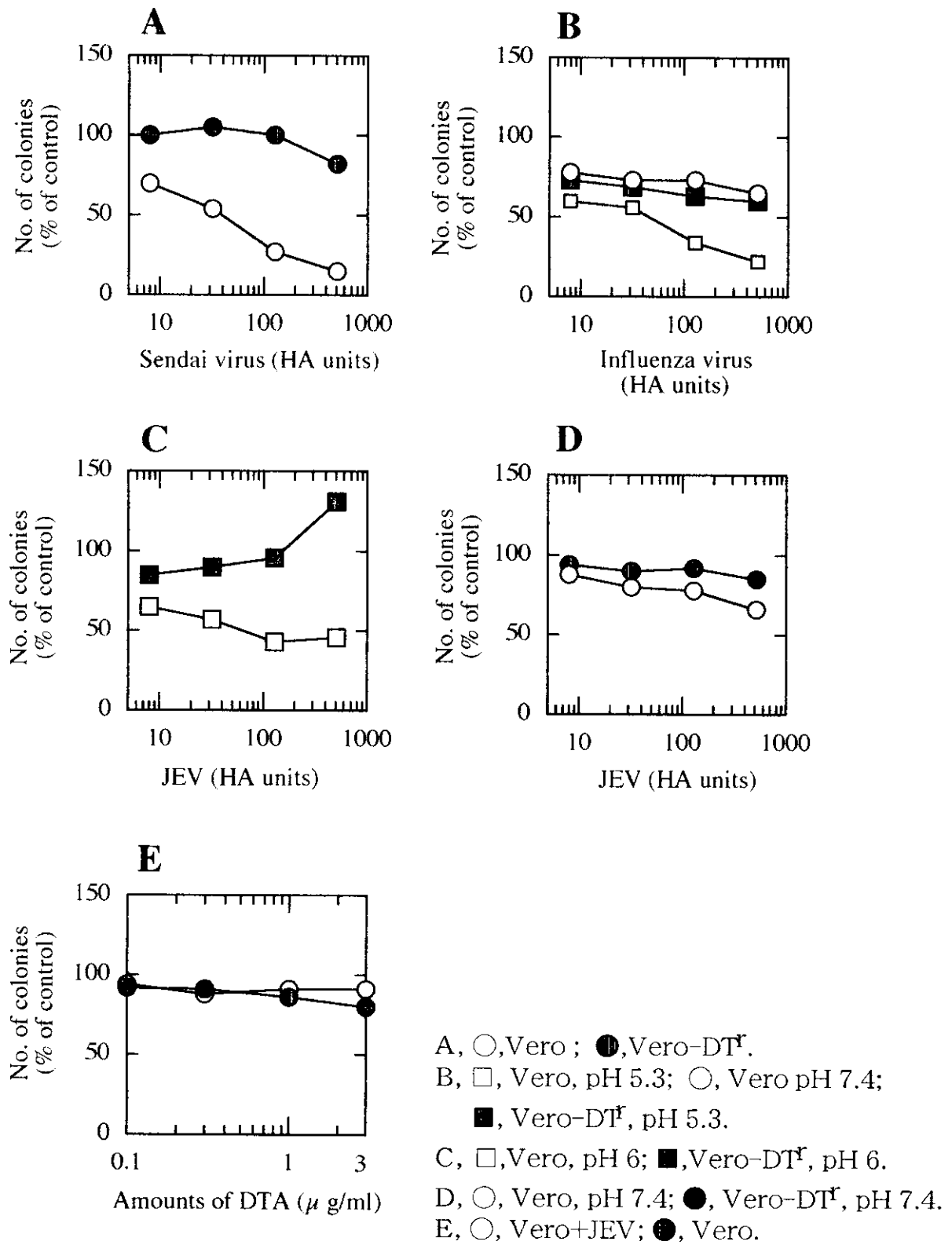


図1 DTAを負荷したJEV, influenza virusおよびSendai virusによる細胞毒性

Table Effects of treatment with monoclonal antibodies on the cytotoxicity of Japanese encephalitis virus encapsulating fragment A of diphtheria toxin (DTA -JEV).

Antibodies	No. of cell colonies (Average \pm SD)	Ratio to Control (%)
Mock	75.2 \pm 3.3	100.0
NM IgG	44.4 \pm 2.6	59.0
MAb 503	63.5 \pm 1.3	84.4
MAb 504	40.2 \pm 1.6	53.5
Control IgG	78.8 \pm 3.3	104.8

分担研究報告書

シンドビスウイルスレセプタータンパクの N 末端アミノ酸分析に関する研究

主任研究者：倉根一郎（国立感染症研究所ウイルス第一部）

協力研究者：奴久妻聡一（神戸市環境保健研究所 寄生体部）

奴久妻智代子（神戸市環境保健研究所 寄生体部）

研究要旨：ウイルス感染の最初のステップは細胞表面のレセプターに結合することであり、この結合を阻害することは感染防御の有効な治療のひとつといえる。我々は広範な宿主域を有するシンドビスウイルス(以下 SIN と略す)のニワトリ胎児線維芽細胞 (CEF)上のレセプターを Virus Overlay Protein Binding Assay (VOPBA)により 95kDa と 175kDa の2つのタンパクが検出した。本研究ではこれらのタンパクを同定するために N 末端のアミノ酸分析を行ったところ、95kDa タンパクについては N 末端のアミノ酸 6 残基を Pro-Glu-Ala-Val-Gln-Thr (PEAVQT)と決定できた。95kDa タンパクの 6 残基を SWISS-PRG Protein data base より検索したところ、Heat shock protein 90-alpha, Early 53kDa protein, Acetyl-coenzyme A carboxylase carboxyltransferase subunit beta および Probable DNA packing protein の 4 種類のタンパクが候補としてあがった。この 4 種類のタンパクで Heat shock protein 90-alpha がニワトリ由来であることから SIN がこのタンパクに結合する可能性があると考えられた。

A. 研究目的

ウイルス感染症の治療は過去に種々の試みがなされているにもかかわらず、現在でも有効な治療法は少ない。ウイルスが細胞表面のレセプターに結合することが感染成立の最初のステップである。それゆえに、ウイルスのレセプターへの結合を阻害することは感染防御の有効な治療のひとつといえる。SIN はアルファウイルスの一種であり、ヒトに感染すると発熱、頭痛、関節痛および発疹を引き起こす。SIN は細胞での

増殖が良好であることから培養細胞での感染阻害実験が短期間にしかも容易に行うことからレセプターの単離、解析が進んでいる。我々は以前、SIN の CEF 細胞上のレセプターを VOPBA により 95kDa と 175kDa の2つのタンパクが検出した。本研究では我々はこれらのタンパクを同定するために、N 末端のアミノ酸配列を決定し、その結果を元に SWISS-PRG Protein data base より検索した。

B. 材料と方法

1. CEF 膜タンパクの精製

CEF2 代目の細胞を SEAT バッファー (0.25M sucrose, 1mM EDTA, 10mM acetic acid, 10mM triethanolamine, pH7.4) 2ml でホモジナイズ 240g で 15 分間遠心後、上清を回収した。この上清を 42,000g で 1 時間超遠心後、上清を回収し、さらに 105,000g で 2 時間超遠心後、pellet を PBS で懸濁し膜タンパクとして用いた (Fig. 1)。

2. N 末端のアミノ酸分析

CEF 膜タンパクを 7.5% SDS-PAGE した後、PVDF 膜に electroblot した。PVDF 膜を Coomassie blue R-250 液で 5 分間染色後、脱色を行い風乾した。VOPBA で検出された 95kDa と 175kDa の位置のバンドを PVDF 膜から切り出し、これらのサンプルを HPG1005A Protein Sequencing system にて N 末端のアミノ酸 6 残基を分析した。

3. Data base からの検索

N 末端のアミノ酸 6 残基の結果をもとに SWISS-PRG Protein data base で検索を行った。

C. 研究結果

VOPBA により検出した SIN の CEF 細胞上のレセプターと考えられる 95kDa と 175kDa の 2 つのタンパクを電気泳動後、electroblot した PVDF 膜から切り出し HPG1005A Protein Sequencing system にて N 末端のアミノ酸 6 残基を分析した。その結果、95kDa タンパクは Fig. 2 に示した配列分析の cycle1 から cycle6 のチャートから N 末端のアミノ酸 6 残基を

Pro-Glu-Ala-Val-Gln-Thr (PEAVQTT) と決定できた。175kDa タンパクはサンプル量が微量 (100 pmol 以下) のためかピークの読み取りが困難で解析不可能であった。95kDa タンパクの 6 残基を SWISS-PRG Protein data base より検索したところ、Heat shock protein 90-alpha, Early 53kDa protein, Acetyl-coenzyme A carboxylase carboxyl transferase subunit beta および Probable DNA packing protein の 4 種類のタンパクが候補としてあがった (Fig. 3)。この 4 種類のタンパクで Heat shock protein 90-alpha がニワトリ由来であり、その分子量から判断して SIN がこのタンパクに結合する可能性があると考えられた。

D. 考察

VOPBA により検出した SIN の CEF 細胞上のレセプターと考えられる 95kDa の N 末端のアミノ酸分析により、Heat shock protein 90-alpha, Early 53kDa protein, Acetyl-coenzyme A carboxylase carboxyl transferase subunit beta および Probable DNA packing protein の 4 種類のタンパクが候補としてあがり、この 4 種類のタンパクで分子量やニワトリ由来であることから判断して SIN が Heat shock protein 90-alpha に結合する可能性が考えられた。従来、Heat shock protein 90-alpha は細胞質に豊富に存在し、細胞表面に発現していないと考えられていた。しかしながら、近年 71-kDa の Heat shock cognate protein (HSC70) が細胞表面に発現し HTLV-I によるシンシチウム形成のための細胞レセプターとして働くことが報告されていることから、