

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

陽イオン親和性薬剤のクロルプロマジン添加による Vero cell
への日本脳炎ウイルス感染の抑制

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)
赤塚俊隆(埼玉医科大学微生物学教室)

研究要旨 日本脳炎ウイルスの脊椎動物由来培養細胞への侵入様式を観察した。クラスリン依存性およびカベオラ依存性エンドサイトーシス、およびマクロピノサイトーシスを抑制するクロルプロマジン、ナスタチン、そしてサイトカラシン D を用いて Vero cell へのウイルス増殖感染への影響を観察した。日本脳炎ウイルスの増殖感染はクロルプロマジンの前処理で有意に抑制されたが、ナスタチン、サイトカラシン D では抑制されなかった。クロルプロマジン処理細胞へ吸着したウイルスは、エンドソーム画分に検出されなかった。ウイルス吸着後 37℃30 分間保温した時、未処理細胞では核周辺にウイルス抗原が検出されたが、クロルプロマジン処理細胞では細胞内にウイルス抗原は検出されなかった。日本脳炎ウイルスの Vero cell への侵入にクラスリン依存性エンドサイトーシスの関与が示唆された。

A. 研究目的

デングウイルスを始めとする蚊媒介性フラビウイルスの感染メカニズムを研究する目的で、日本脳炎ウイルスを例として細胞レベルのウイルス感染初期過程を解析した。

フラビウイルスの遺伝子はウイルスエンベロープと宿主細胞の 2 重の膜に隔てられ、ウイルス感染が成立するためには遺伝子がこの 2 重の膜を通過する必要がある。平成 13 年度

は日本脳炎ウイルスと Vero cell が弱酸性条件で膜融合することを報告し、感染初期過程において細胞内の酸性小胞であるエンドソーム内でウイルスエンベロープとエンドソーム膜との融合によるウイルスのアンコーティングを示唆した(原稿準備中)。

平成 14 年度は日本脳炎ウイルスの Vero cell への感染に、宿主細胞のエンドサイトーシスの関与を観察した。

B. 研究方法

日本脳炎ウイルスは JaGAR-01 株を C6/36 cell で増殖後、精製して用いた。Vero cell は 10% FCS を含む Dulbecco-MEM で培養した。ウイルス接種細胞より後核乳剤を調製し、Percoll 密度勾配遠心で分画する方法は、すでに公表された方法(Nawa, *Microbiology and Immunology*, vol 40, 1996; Nawa, *Microbiology and Immunology*, vol 41, 1997; Nawa, *Archives of Virology*, vol 143, 1998)にしたがった。

クロルプロマジン、ナイスタチンおよびサイトカラシン D が細胞の clathrin-dependent endocytosis, caveola-dependent endocytosis および macropinocytosis をそれぞれ抑制することは、Sieczkarski & Whittaker (*Journal of General Virology*, 2002)の総説で述べられている。

薬剤処理による細胞の生存への影響は、市販の細胞増殖測定キット (Roche Diagnostics GmbH, Germany)で観察した。細胞の形質膜およびエンドソームの検出は、biotin-XX-sulfosuccinimidyl ester (Molecular Probes, USA) および horseradish peroxidase-conjugated human transferrin (Rockland Inc. USA)を用いた。

その他、clathrin heavy chain に対する抗体(PROGEN, USA)、日本脳炎ウイルス中和活性を示すモノクローナ

ル抗体#503 (Kimura-Kuroda & Yasui, *Journal of General Virology*, 67, 1986)、および FITC-anti Mouse IgG, F(ab')₂ (ZYMED, USA)などを用いた。

(倫理面への配慮)

本研究は試験管内実験であったので、倫理面での配慮の必要はなかった。

C. 研究結果

1)ウイルス増殖感染における薬剤処理の影響 (図 1 a)。

Lab-Tek Chamber Slide で培養した Vero cell (2.1×10^5 cells/well)をクロルプロマジン($10 \mu\text{g/ml}$)、ナイスタチン($10 \mu\text{g/ml}$)およびサイトカラシン D($5 \mu\text{g/ml}$)を含む培地で 37°C 1 時間培養した。その後ウイルス(6.7×10^7 PFU)を接種し、薬剤存在下に 4 時間培養した。4 時間後細胞を洗い、MAb 503 ($200 \mu\text{g IgG/well}$, 144 ND₅₀)を含む培地で 3 日間培養し、ウイルス増殖細胞を Dengue 患者血清由来 IgG および FITC-抗ヒト Ig F(ab')₂ ヤギ抗体で検出した。

感染 4 日後のウイルス抗原陽性細胞の割合は、未処理細胞では 60%であった。クロルプロマジン処理細胞、ナイスタチン処理細胞およびサイトカラシン D 処理細胞ではそれぞれ 11%、35%、42%であった。3 種の薬

剤を組み合わせた時の抗原陽性細胞は、それぞれ 2~5%であった。ナイス タチンとサイトカラシン D の組み合わせでは 35%の陽性率であった。

2) 薬剤処理による細胞の生存への影響を観察した(図 1b)。

細胞の生存は、接種翌日と 4 日目に測定した。薬剤処理は、単独でも組み合わせた時でも細胞の生存に有意に影響しなかった。

図 1 a および b の成績より、日本脳炎ウイルスの増殖感染がクロルプロマジン処理によって抑制されたことが示された。

3) クロルプロマジン処理細胞内におけるウイルス分布 (図 2a, b)。

クロルプロマジン処理前後の細胞へウイルスを接種し、37°C 15 分間保温した時の細胞の後核乳剤を Percoll 密度勾配遠心法で分画し、細胞内へのウイルスの取り込みを観察した(図 2b)。後核乳剤におけるエンドソーム画分および形質膜画分の同定は、パーオキシダーゼ標識ヒト・トランスフェリンの取り込み、および細胞表面のビオチン標識でおこなった(図 2a)。

トランスフェリンおよび形質膜画分は異なる位置に分画された(図 2a)。ウイルス感染細胞の後核乳剤でのウイルス粒子抗原の位置は、薬剤処理

前後で異なった(図 2b)。未処理細胞ではトランスフェリンおよび形質膜の位置と一致する密度範囲に分画された。薬剤処理細胞では形質膜画分に一致した密度範囲に分画され、エンドソームへのウイルスの分布は観察されなかった。

4) クロルプロマジン処理細胞でのウイルスの取り込みを観察した(図 3 a~d)。

薬剤処理前後の細胞へ M.O.I. 10,000 PFU/cell 以上でウイルスを接種した。37°C 30 分間保温したのち細胞を固定し、フラビウイルス特異的モノクローナル抗体(D1-4G2)および FITC 標識抗マウス IgG ヤギ抗体でウイルス抗原を検出した。

未処理細胞(図 3 a)では核周辺へのウイルス抗原の集積が観察されたが、薬剤処理細胞(図 3 b)では細胞内のウイルス抗原は検出されなかった。

薬剤処理前後の Clathrin heavy chain の分布を観察した。未処理細胞(図 3 c)では細胞質全体に clathrin 抗原が検出されたが、薬剤処理細胞(図 3 d)では核周辺に clathrin 抗原が検出された。

5) クロルプロマジンによるウイルス感染の抑制が細胞内への取り込みの抑制であって、細胞内におけるウイルス増殖を抑制しないことを観察

した(図 3 e, f)。

未処理細胞(図 3 e)および薬剤処理細胞(図 3 f)でともに感染 4 日後に細胞質にウイルス抗原が検出された。しかし、抗原陽性細胞の数が相違した。

D. 考察

これまで電子顕微鏡を用いた形態的観察で、感染初期に細胞内の小胞中のウイルス粒子が観察された。次に、塩化アンモニウム、バフィロマイシンなど細胞内酸性小胞の酸性化抑制がフラビウイルス感染の抑制に繋がることが報告された。これらの観察はいずれもフラビウイルスの感染初期過程に細胞内の酸性小胞の関与を示唆するものであった。現在、細胞表面へ吸着したウイルスが細胞内へ侵入する様式には 3 つの経路が存在し、ウイルスによって異なる経路で侵入すると説明されている(Sieczkarski & Whittaker *Journal of General Virology*, 2002))。しかし、細胞表面へ吸着したフラビウイルスが小胞へ到達するまでの経路は解析されなかった。

クロルプロマジンはヒト線維芽細胞表面における clathrin coated pit の配置を抑制することによってリガンドの取り込みを阻害した(Wang et al. *Journal of Cell Biology*, vol. 123, 1993)

と報告されている。クロルプロマジン処理が日本脳炎ウイルスの Vero cell への感染を抑制した結果、およびエンドソーム画分へのウイルス分布の抑制は、細胞表面へ吸着したウイルスが clathrin-dependent endocytosis で取り込まれることを示唆した。

E. 結論

デングウイルスを始めとする蚊媒介性フラビウイルスの感染メカニズムを解析するためのモデルとして、日本脳炎ウイルスの Vero cell への感染に宿主細胞の clathrin-dependent endocytosis の関与が明らかとなった。

Clathrin coated pit より clathrin coated vesicle によって細胞内へ取り込まれたウイルスが細胞内の酸性小胞であるエンドソームへ運ばれ、エンドソーム内の酸性条件でウイルスとエンドソーム膜との融合でウイルスのアンコーティングが起るとの説明と矛盾しない(see review, Heinz & Allison, *Advances in Virus Research*, vol. 55, 2001)。

F. 健康危険情報

実験はすべて生物学的安全基準にしたがって実施された。

G. 研究発表

本研究内容は *Journal of General*

Virology 誌に 2003 年中に刊行される
予定である。

H. 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

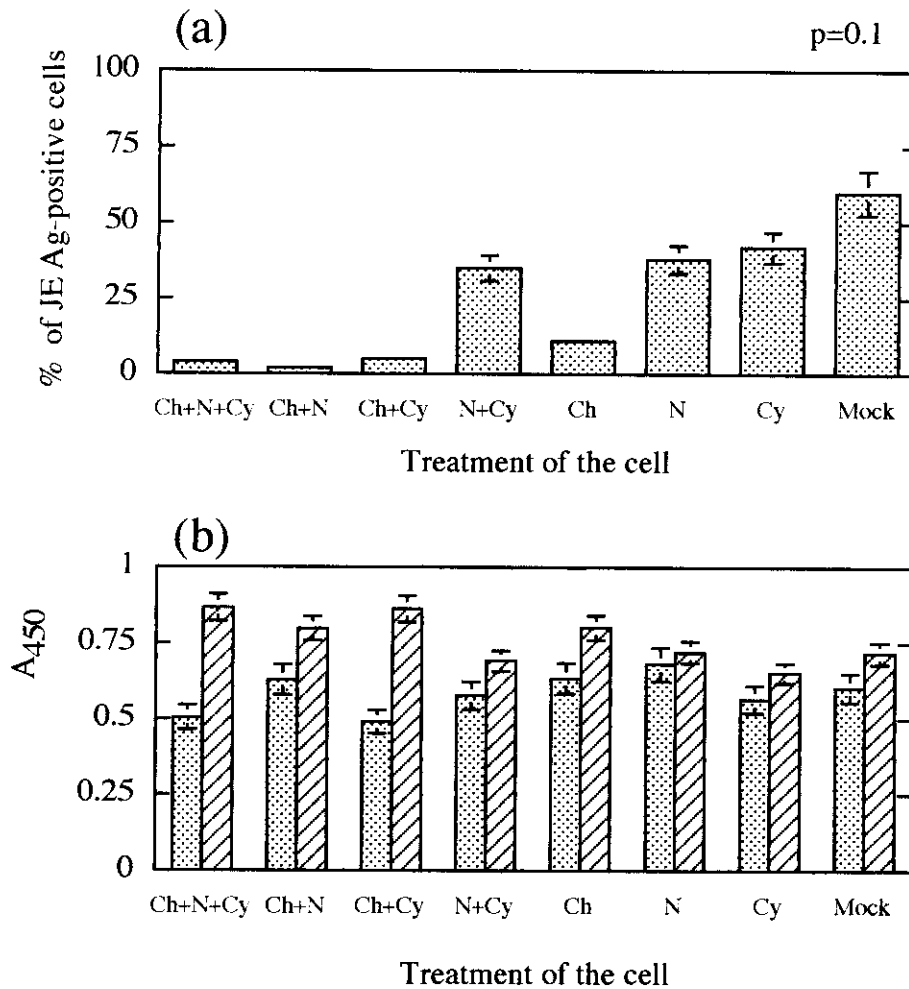


Fig. 1 Effects of the drug treatment for the productive infection of the virus.

Vero cells were treated with chlorpromazine (Ch), nystatin (N), and cytochalasin D (Cy) according to the method described in the text. Images from the experiments were recorded for quantitative analysis on Fuji SUPERIA 400 color print film. For each experimental point, four fields or more were randomly chosen, and photographed with filter sets for FITC using a Nikon Fluophoto microscope and a 20 X objective lens. a) 100 cells were scored in each picture and the percentages of JEV antigen-positive cells were calculated. b) Cell viability was measured by using the XTT assay kit according to the manufacturer's manual. Shaded and striped columns indicate cell viability as the spectrophotometrical absorbance at 40 nm of wavelength (A_{450}) obtained on the 2nd and the 4th day of incubation, respectively. Data indicate as average of two separate assays, and bars indicate standard error in each assay.

☒ 1

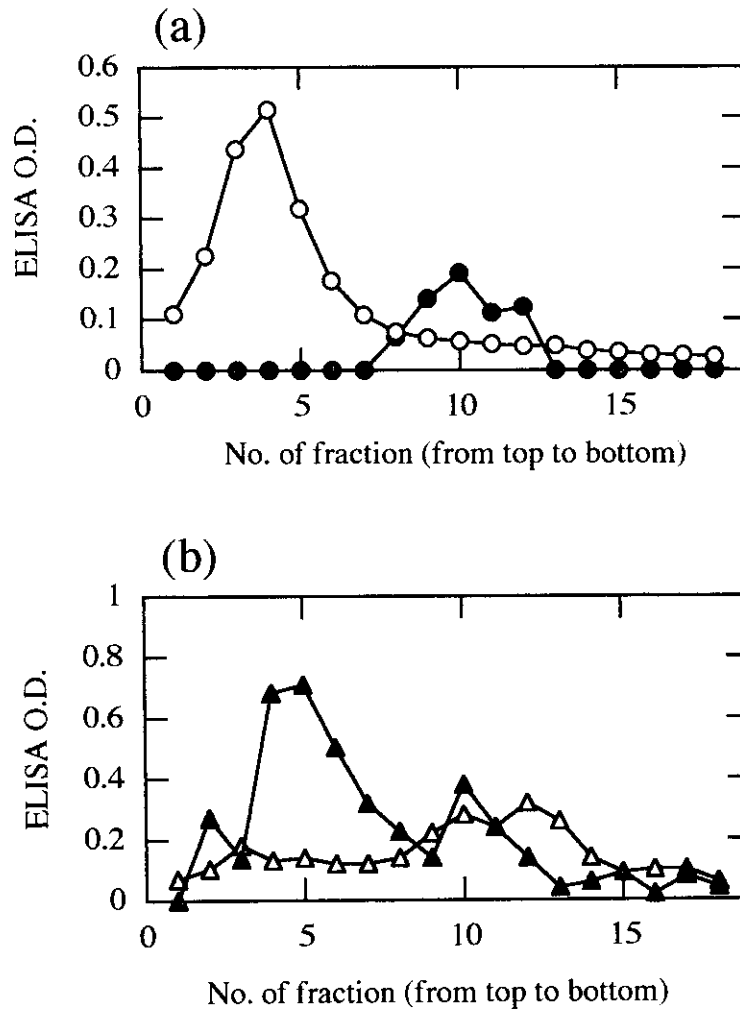


Fig. 2 Subcellular distribution of JEV in the drug-treated Vero cells.

The endosome (open circle) and the membrane (closed circle) fractions were indicated in panel (a), and virion antigen in the control (closed triangle) and the drug-treated (open triangle) cells were indicated in panel (b). After centrifugation, the gradients (2.0 ml/tube) were fractionated to 18 tubes (0.1 ml/tube) from top to bottom. Each fraction was mixed with an equal volume (0.1 ml) of 0.2% Triton X-100-PBS, and then divided to two parts. An aliquot (0.1 ml) was used to measure the protein contents by BCA Protein Assay Reagent, and remaining sample (0.1 ml) were used to detect the antigen by ELISA. Data indicate ELISA O.D. as the spectrophotometrical absorbance at 492 nm of wavelength (per mg of protein) obtained with each fraction.

图2

図3の説明

Figure 3 Effects of chlorpromazine on the uptake of JEV and intracellular distribution of clathrin in the cells.

Vero cells were incubated in the absence (A, C and E) and presence (B, D and F) of 10 $\mu\text{g/ml}$ of chlorpromazine at 37°C for 1 h. The cells were then inoculated with JEV (A and B) for at 37°C for 30 min. Virus-inoculated (A and B) and mock inoculated (C and D) cells were fixed with ethanol and reacted with the anti-flavivirus monoclonal antibody, 4G2 IgG (A and B) and anti-clathrin heavy chain IgG (C and D). Panels E and F shows viral antigen production in the control (E) and chlorpromazine-treated (F) cells on day 4 after infection according to the method described in Fig. 1a.

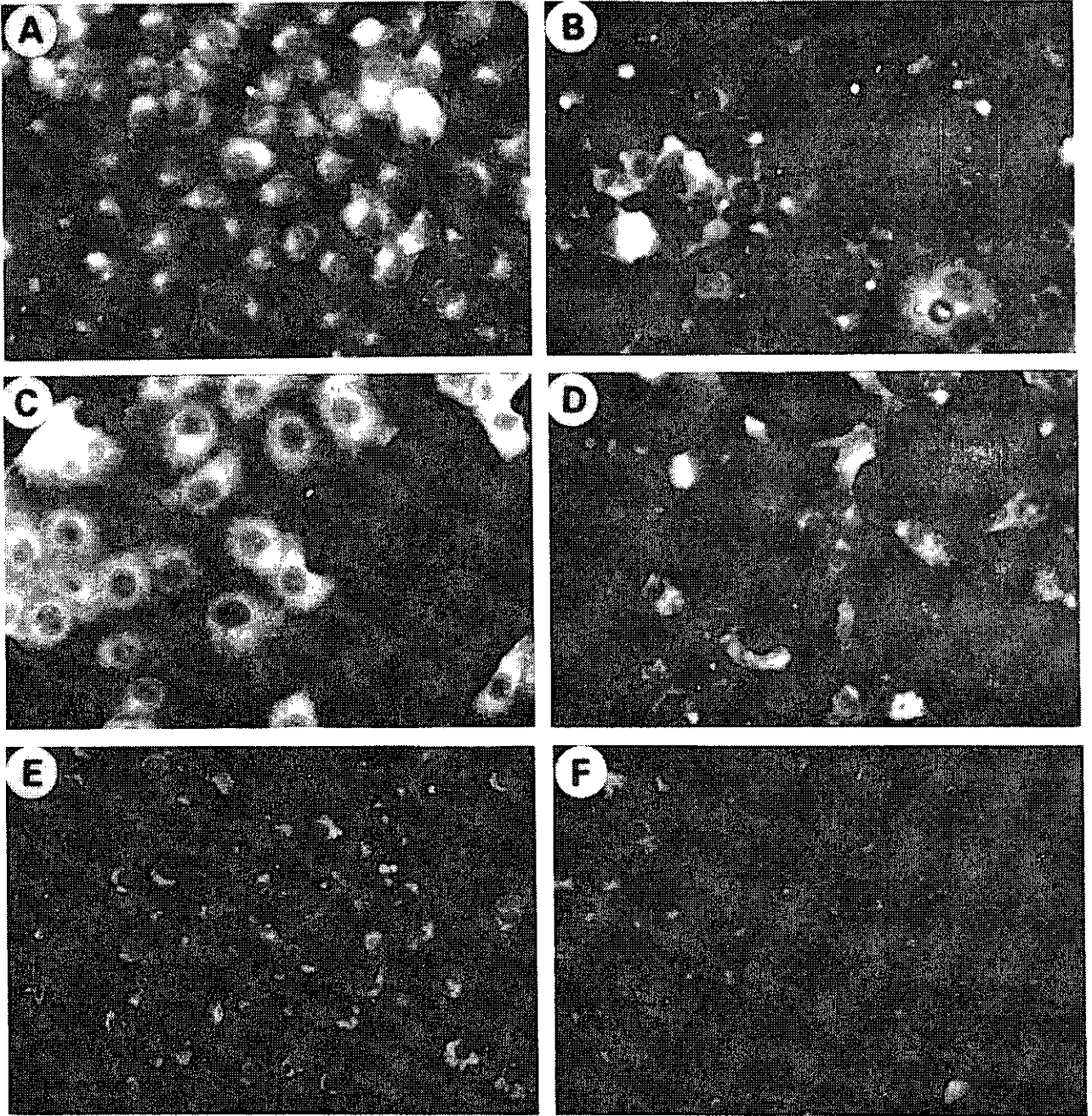


图3