

蚊媒介性ウイルスのベクター要求性の解明と創薬探索 に関する研究

所属 国立感染症研究所 感染症情報センター

研究者 新井 智

研究要旨 日本脳炎ウイルスのベクター内での増殖に影響を与えるファクターの検索を行った。その結果、ウイルスのベクター内での増殖には、たった1つのアミノ酸変異で増殖性が変化する可能性が明らかになった。

A. 研究目的

蚊によって媒介されるウイルスには、空気感染や接触感染で伝播するウイルスと異なりベクターを必要とする生物学的な重要性が示唆される。そこで、蚊などベクターステージをそのライフサイクルに保有するウイルスのベクターステージの生物学的意義およびウイルスライフサイクルにおけるベクターの重要性とウイルス生存への影響を明らかにすることを目的として実施した。本年は、まず環境中の自然感染の現状把握、ウイルス活動状況などの疫学情報を収集しつつ、日本における日本脳炎ウイルスの自然感染状況を把握し、現在の日本の感染状況を明らかにし、現在も感染リスクが存在するか検討する。また、ウイルスライフサイクルを分子レベルで理解するために蚊の中で増殖しにくいウイルスの全塩基配列を決定し、ベクターである蚊の中でのウイルス増殖メカニズムに影響を与えるファクターのうち、ウイルス側のファクターの検索を進めた。

B. 研究方法

自然感染状況の把握には、日本脳炎ウイルス非構造タンパク質の一つである Nonstructural protein 1 (NS1)を用いた。組み換え NS1 タンパク質を発現す

る、組み換え細胞を抗原に使用してヒト血清の抗体価の測定を行った。ヒト血清は、インフォームドコンセントの採られた血清バンク(国立感染症研究所)に保管されている血清とインフォームドコンセントの採られた宮崎県衛生研究所が採取、収集した血清を用いた。

蚊の中での増殖性の低下したウイルス株には、家畜で使用されている、日本脳炎弱毒生ワクチン株を使用した。ワクチン株との比較には、弱毒前の親株を使用した。ワクチン株は、日本で市販されているワクチン株、at 株、m 株と阪大微生物学研究所から分与頂いた ML17 株を用いた。親株は AT31 株と JaOH566 株をそれぞれ使用した。m 株の親株である Mukai 株は既に消失し現存していなかったため、比較できなかった。

ウイルス RNA の抽出には Quiagen virus RNA 抽出キットを用いた。Reverse Transcript 反応には Super Script III(インビトロジェン)を用いて、PCR には、LA-taq(Takara)を用いた。5' 末端部分と 3' 末端部分は RACE 法によって決定した。塩基配列の決定は、ABI310 シークエンサーで決定した。遺伝子配列の比較は、Genetyx-win ver. 6 を用いて行った。

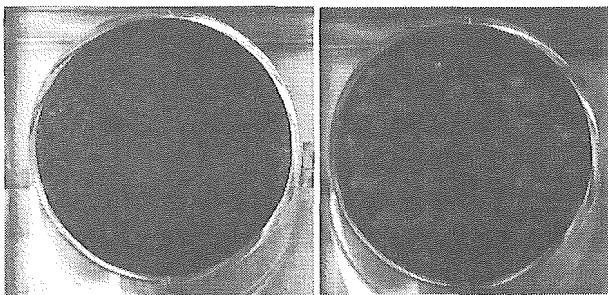
倫理面への配慮に関しては、今回使用したヒト血清を用いた調査では、すべてインフォームドコンセントが採られている血清を用いた。また、使用に当たっては神戸大学医学部において倫理審査を受け調査に用いた。

C. 研究結果

2001年に採血された宮崎県、福岡県、山梨県、長野県、愛知県、秋田県、福島県、山形県の住人のNS1に対する抗体保有率は、宮崎県4%、福岡県5.7%、山梨県2.9%、長野県4.9%、愛知県6.7%、秋田県2.2%、福島県6.3%、山形県0.5%で、全体で約4.4%であった。NS1に対する抗体持続は2~3年と推定されているため、年間約2~3%のヒトが日本脳炎ウイルスに感染していると推測された。しかしながら、地域性や年齢群に統一的な特徴は確認されなかった。

蚊(ベクター)の中での日本脳炎ウイルス増殖メカニズムを明らかにするため、蚊での増殖性が良好なウイルス株と蚊の中での増殖性が極めて低下したウイルス株を比較した。家畜で使用されている生ワクチン株は、病原性が低く、ベクターによる媒介能が低下していることが知られている。また、Vero細胞に感染させても、親株に比べ非常に小さなCPEが認められることが知られている(図1)。

図1



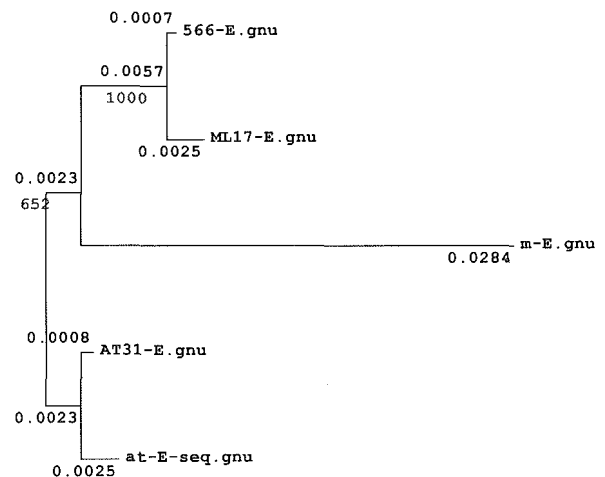
図左は、at株を感染させたVero細胞、図右は、at株の親株であるAT31株を感染させた時のCPEを示す。

そこで、現在日本で使用されている弱毒生ワクチン株の全塩基配列を決定し、親株と比較することで病原性およびベクター親和性に影響を与える部位の検索を行った。

ワクチン株3株と親株2株のEnvelopeを基にしたphylogeneticな解析には、図2の様な関係であった。

図2

[GENETYX : Evolutionary tree]
Date : 2005.3.9
Method: NJ
Bootstrap Trial: 1000



566-E.gnu;JaOH566株、ML17-E.gnu;ML17株、m-E.gnu;m株、AT31-E.gnu;AT31株、at-E.gnu;m株を示す。

各ウイルス株の配列は、10977bp、推定されたアミノ酸数は3432aaであった(DDBJ登録申請準備中)。親株とワクチン株の間でアミノ酸レベルの違いが認められたのは、ワクチン株at株と親株AT31株の間で10aa、ワクチン株ML17株と親株JaOH566株の間では8aaであった。それぞれのワクチン株は、ワクチンとして弱毒化されているものの、親株とアミノ酸レベルの変異はわずかであった。ワクチン株すべてに共通し、しかも親株と異なるアミノ

酸は日本脳炎ウイルス構造タンパク質のEnvelope領域のわずかに1アミノ酸であった。この変異は、中華人民共和国でヒトに対して使用されているSA-14-14-2株(生ワクチン株)とSA14(親株;野生株)にも同様に保存されていた。これらの結果から、この1アミノ酸の変異は弱毒生ワクチン株に共通・必須変異である可能性が示唆された。この点を明らかにするために今後、組み換えウイルスを作出し他の変異部位も含めて検証する必要がある。

D. 考察

日本脳炎ウイルス非構造タンパク質に対する抗体価の測定により、現在もなお日本脳炎ウイルスの自然感染が存在していることが明らかになった。しかしながら、患者報告数は、毎年数名と非常に少ない数で推移しているため、感染リスク自体が低下したのか、それとも感染率は20年前と変化せず、発症率のみが低下したのか解析する必要がある。今後更に複数の測定方法で抗体価を測定し、より正確な自然感染状況の把握に努める必要があるだろう。

家畜の弱毒日本脳炎ワクチン株の親株とワクチン株の塩基配列の比較による弱毒メカニズムの解析により、弱毒に影響するアミノ酸変異は極めて少数の変異で弱毒していることが明らかになった。親株とワクチン株の間のアミノ酸変異は、8~10アミノ酸で、しかもワクチン株共通のアミノ酸変異は僅かに1アミノ酸であった。この結果は、ウイルスの病原性や、親和性、増殖性は僅かなアミノ酸変異で大きな影響を受けることを意味しており、このような部位の特定は、日本脳炎ウイルスに限らず、ベクターを介して感染するウイルスのベクター親和性や、増殖メカニズムを明らかにする上で貴重な情報と考えられる。今回、明らかになった1アミノ酸の変異は、1999年

に米国ニューヨークでアウトブレイクが確認されたウエストナイルウイルスやオーストラリアに存在しているクンジンウイルスにも保存されていたため、これらのウイルスに対しても病原性に関与している可能性があり、非常に興味深い結果であった。

E. 結論

2001年度に採血された血液を基にした自然感染率の推定によって、年間約2~3%のヒトに日本脳炎ウイルスの自然感染が推定された。日本で使用されている家畜用の生ワクチン株(at株、ML17株、m株)、中華人民共和国で使用されている生ワクチン株(SA14-14-2)とそれらの親株(AT31株、Ja0H566株、SA14株)のアミノ酸配列の比較によって、ワクチン株に共通のアミノ酸変異はわずかに1カ所のみであった。そのメカニズムは今回の結果では明らかでは無いが、1アミノ酸の変異が病原性やベクター内での増殖に影響を与えている可能性が示唆された。今後、本変異の日本脳炎ウイルス弱毒への影響を組み換えウイルスを用いて解析する予定である。

F. 研究発表

論文発表

新井 智、高崎智彦、多屋馨子、早川丘芳、倉根一郎、岡部信彦、近年の日本脳炎患者発生状況および感染リスク、*獣医畜産新報* 2004年8月

学会発表

1. 正田瑞恵、新井 智、多屋馨子、岡部信彦、小西英二、近年の日本におけるヒトの日本脳炎ウイルス自然感染状況、第52回日本ウイルス学会、横浜市、2004年11月

2. Arai, S., Tanaka-Taya, K., Takasaki, T.,

Kurane, I., Okabe, N. and Vaccine Preventable Disease Surveillance Group. Japanese encephalitis virus is still endemic in Japan. Fourth world congress on vaccines and immunization. Tsukuba, Japan. Oct. 2004

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし