

ら4型)はデンググループに属し、この4種間の抗原交差性が相互の特異免疫誘導に影響したものと考えられる。我々は、これを交差反応性と区別して「交差免疫原性」と称した。この交差免疫原性は、同時投与だけでなく、デング4価DNAワクチンの接種前後に蛋白抗原を投与した場合においても示された。この交差免疫原性が、デング4価DNAワクチンのドーズ低減を可能にしたメカニズムと考えられる。交差免疫原性の詳細な機序は不明であるが、4種のDENV間における免疫レベルでの分子類似性に基づくものと思われる。自然暴露を比較的頻繁に受ける流行地では、交差免疫原性によりデング4価DNAワクチンの効果は高くなり、さらなるドーズ低減が可能になると考えられた。

E. 結論

蛋白混合針無投与方法により、フラビウイルスDNAワクチンは低ドーズ(0.1~1 µg)でも動物に中和抗体を誘導できることが示された。交差免疫原性が効果的に働くためと考えられた。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Jun-ichi Imoto and Eiji Konishi: Dengue tetraivalent DNA vaccine increases its immunogenicity in mice when mixed with a dengue type 2 subunit vaccine or an inactivated Japanese encephalitis vaccine. *Vaccine* 25, 1076-1084, 2007.
- 2) Tomohiro Ishikawa, Tomohiko Takasaki, Ichiro Kurane, Souichi Nukuzuma, Takashi Kondo, and Eiji Konishi: Co-immunization with West Nile DNA and inactivated vaccines provides synergistic increases in their immunogenicities in mice. *Microbes and Infection* 9, 1089-1095, 2007.
- 3) Yoko Kitai, Mizue Shoda, Takashi Kondo and Eiji Konishi: Epitope-Blocking Enzyme-Linked Immunosorbent Assay to Differentiate West Nile Virus from Japanese Encephalitis Virus Infections in Equine Sera. *Clinical and Vaccine Immunology* 14, 1024-1031, 2007.
- 4) Atsushi Yamanaka, Saori Kosugi, and Eiji Konishi: Infection-enhancing and neutralizing activities of mouse monoclonal antibodies against dengue type 2 and 4 viruses are controlled by complement levels. *Journal of Virology* 82, 927-937, 2008.
- 5) Eiji Konishi, Yoko Kitai, and Takashi Kondo: Utilization of Complement-Dependent Cytotoxicity to Measure Low Levels of Antibodies: Evaluation in a Model of Japanese Encephalitis Nonstructural Protein 1. *Clinical and Vaccine Immunology* 15, 88-94, 2008.
- 6) Tomohiro Ishikawa, Douglas G. Widman, Nigel Bourne, Eiji Konishi, Peter W. Mason: Construction and evaluation of a chimeric pseudoinfectious virus vaccine to prevent Japanese encephalitis. *Vaccine* 26, 2772-2781, 2008.
- 7) Teiichi Matsunaga, Mizue Shoda, Eiji Konishi: Japanese encephalitis remains common in Japan. *Pediatric Infectious Disease Journal* 27, 769-770, 2008.
- 8) Eiji Konishi, Kyoko Yagawa, Atsushi Yamanaka: Vero Cells Infected with Vaccinia Viruses Expressing Japanese Encephalitis Virus Envelope Protein Induce Polykaryocyte Formation under Neutral Conditions. *Japanese Journal of Infectious Diseases* 61,

410-411, 2008.

2. 学会発表

1) Eiji Konishi, Mizue Shoda, Tomoyuki Suzuki, Takashi Kondo, Satoru Arai, Keiko Tanaka-Taya and Nobuhiko Okabe: Continued transmission and need for booster doses in an endemic country. Vaccines for Viral Infections in Developing Countries Workshop, 2006.

2) Tomohiro Ishikawa, Tomohiko Takasaki, Ichiro Kurane, Souichi Nukuzuma, Takashi Kondo, Eiji Konishi: A west Nile DNA vaccine elicits effective immune responses in mice by simultaneous administration with the commercial inactivated vaccine. Fortieth Joint Viral Diseases Panel Meeting US-Japan Collaborative Medical Sciences Program, 2006.

3) Tomohiro Ishikawa, Yoko Kitai, Takashi Kondo, Peter W. Mason, Eiji Konishi: Current status of Japanese encephalitis virus circulation in Japan: surveys of antibodies to NS1 and implications of deletions in the 3'-untranslated region. Forty-First Joint Viral Diseases Panel Meeting US-Japan Collaborative Medical Sciences Program, 2007.

4) Atsushi Yamanaka, Saori Kosugi, Eiji Konishi: Antibody-dependent enhancement of dengue virus infection controlled by complement levels. The 42nd Joint Viral Diseases Panel Meeting US-Japan Collaborative Medical Sciences Program, 2008

5) Atsushi Yamanaka, Yohei Sakai, Eiji Konishi: High prevalence of antibodies to Japanese encephalitis virus among

inhabitants in Java Island, Indonesia, relative to a small pig population. The Forum of the Network of Research Centers on Infectious Diseases Conference. Hanoi, Vietnam, 2008

6) Atsushi Yamanaka, Soegeng Soegijanto, Fedik A. Rantam, Eiji Konishi: A simple method for evaluating dengue vaccine effectiveness using mice. Asian-African Research Forum on Emerging and Reemerging Infections-2008, Hokkaido, Japan, December 2008

H. 知的財産権の出願・登録状況

「ウエストナイルウイルス感染の鑑別方法」小西英二、国立大学法人神戸大学、特願 2006-236527

デング熱患者における尿および唾液中のデングウイルス遺伝子検出 およびチクングニヤウイルス感染症実験室診断法の開発

研究分担者；高崎智彦（国立感染症研究所ウイルス第一部）
研究協力者；小滝 徹、平山隆則、原田文植、田島茂、倉根一郎
（国立感染症研究所ウイルス第一部）
水野泰孝、竹下望、加藤康幸（国立国際医療センター）

デング熱は蚊によって媒介されるデングウイルス感染により引き起こされる急性熱性疾患である。デングウイルスには4つの型のウイルスが存在し、抗原的に近縁であるが交差防御能は低い。熱帯・亜熱帯地域特に東南アジア、南アジア、中南米で大きな流行を繰り返しており、年間1億人がデング熱を発症し、50万人以上がデング出血熱を発症すると推定されている。近年、流行地からの入・帰国者などによって輸入感染症としてわが国に持ち込まれる症例が年間100例以上報告されている。通常デングウイルス検出は、急性期の血液から検出されるが、出血傾向の強いデング出血熱患者からの採血が困難な場合も多いため、尿や唾液からのウイルス遺伝子の検出を試みたところ、尿から検出できる症例があることを発見した（2006年）。その後、61症例に関して試みたところ、27症例の尿、唾液5症例から遺伝子を検出し、8症例に関して遺伝子解析にも成功した。尿からの遺伝子検出は、抗体が上昇しウイルスが消失した後も、ウイルス遺伝子を検出できることが確認され、ウイルス型別が特定できることから、実験室診断上有用である。また、18年度には西インド洋諸島の国々で流行し、インド・スリランカに拡大傾向を見せていたチクングニヤ熱の実験室診断法を確立するため陽性血清（患者血清）をフランスパスツール研究所から入手し、診断系を立ち上げた。そして平成18年、スリランカからの輸入症例2例を確認した。

A. 目的

デング熱は蚊によって媒介されるデングウイルス感染により引き起こされる急性熱性疾患である。デングウイルスには4つの型のウイルスが存在し、抗原的に近縁であるが交差防御能は低い。熱帯・亜熱帯地域特に東南アジア、南アジア、中南米で大きな流行を繰り返しており、年間1億人がデング熱を発症し、50万人以上がデング出血熱を発症すると推定されている。デング出血熱では顕著な血小板減少のみならず血漿漏出による胸水・腹水貯留をきたし、重症例ではデングショック症候群に進展する。ワクチンはまだ実用化されておらず特異的治療法はない。デングウイルス感染症の実験室診断は、通常RT-PCR法により血清中からのウイルス遺伝子の検出およびIgM捕捉ELISA法による特異的IgM抗体

の検出によって行われている。しかし、デング出血熱患者においては、出血傾向が強く採血が困難な場合が多い。このため、我々は血清でなく尿や唾液を用いた病原体検出法を検討した。また、デング熱の鑑別疾患で2005年以降、西インド洋諸国、インド、スリランカに流行が拡大したチクングニヤウイルスの実験室診断法を確立する。

B. 方法

デングウイルス

我々は2006年よりデング熱患者の診断検査に際し、血液とともに尿および唾液からのウイルス検出を検討した。デングウイルス輸入症例61例につき、血液（血清）および尿、唾液を採取した。尿は粗遠心し沈渣を除去した後、その上清を簡易濃縮遠心チューブにて濃縮しRNAを抽出し、リアルタイムRT-PCR

(TaqMan 法) により、ウイルス遺伝子を検出した。リアルタイム RT-PCR 法は伊藤ら (J. Clin. Microbiol. 42(12):5935-5937, 2004) の方法により実施した。TaqMan 法で陽性であった検体に関して、通常の RT-PCR を実施し、増幅された検体については、シークエンス解析を行い血清中から検出されたウイルス遺伝子と比較検討した。デング熱診断のための血清抗体検査は IgM 捕捉 ELISA kit および IgG-ELISA kit により IgM および IgG 抗体を測定した。リアルタイム PCR により陽性であった 27 症例の検体に関して、通常の PCR を実施したところ 8 症例の検体で産物が増幅・検出された。cDNA の増幅 (E 遺伝子領域) が確認された検体は、デングウイルス型別用のプライマーを用いてダイレクトシークエンスにより、ベックマンコールター社のプロトコールに従い塩基配列を決定した。

チクングニヤウイルス

1) 逆転写 PCR 用プライマーセット

- ・Chik3512s : (10273bp)
ACG CAA TTG AGC GAA GCA CAT
- ・Chik3991s : (10552bp)
AAA TTG TCC TGG TCT TCC TG

2) リアルタイム PCR (TaqMan 法) 用プライマー&プローブセット TaqMan 用プローブ、プライマー

- ・Probe: Taq-Chik638P
FAM-TACCAGCCTGCACYC-MGB-3'
- ・Primer(F) : Taq-Chik607F (10849)
GCR CCM TCT KTAACG GAC AT
- ・Primer(R) : Taq-Chik672R (10894)
GCC CCC RAA GTC KGA GGA R

(1) IgM 抗体検査法 (IgM 捕捉 ELISA)

抗体検査に必須である患者血清はフランスパスツール研究所、National Reference Center for Arbovirus and Viral Hemorrhagic Fevers) の Dr. HERVE ZELLER から無償で供与いただいた。二次抗体として使用する抗チクングニヤウイルス抗体は、Anti-CHIKV polyclonal Antibody Mouse immune ascitic fluid ATCC VR-1241 を米国 ATCC から輸入し、使用した。抗原は、S27 株 (Af 株) を Vero 細胞で増殖させ使用した。

(2) 中和試験

チクングニヤウイルス (S27 株) および Vero 細胞を用いて、ブランク減少法により測定した。

C. 結果

輸入デング熱 61 症例に関して、尿・唾液中のウイルス遺伝子検査を実施した。61 症例中にはすでに回復期に入った症例も含まれる。血清からウイルス遺伝子が検出できた症例は 37 症例 (検出率 60.7%) であった。一方、尿中から遺伝子が検出された症例は 27 例 (検出率 44.3%)。尿中からデングウイルス遺伝子を検出した検体は、27 例中 26 例で、採尿時点での血清抗デングウイルス抗体は陽性であった。尿中デングウイルス遺伝子の解析にいたった症例 8 例のウイルス型別は、1 型 3 例、2 型 1 例、3 型 1 例、4 型 3 例であった。血液からのウイルス遺伝子も検出できた症例ではいずれも尿中と血中ウイルス遺伝子配列は 100% 一致した。尿中デングウイルス遺伝子は、血中のウイルス遺伝子が検出できない急性期以降でも検出できる症例があった。

平成 18 年にスリランカからの輸入チクングニヤ熱症例を診断した。遷延する関節痛より確定診断に至ったチクングニヤ熱の本邦初症例 (1 例目)、本邦で初めてウイルスが分離されたチクングニヤ熱輸入症例 (2 例目) の 2 症例であった。

D. 考察

すべてのデング熱症例で尿中や唾液中からウイルス遺伝子を検出できるわけではなかったが、検出できる症例が存在することが確認された。すべてのウイルス型で検出できることも確認された。ウイルス血症が消退した後にも、ウイルス遺伝子を検出できることは、ウイルス型別が特定でき、病原体診断上非常に意義がある。血液検体の採取に困難な小児や出血傾向の強い患者に対しては侵襲も少なく非常に有用な方法であると考えられる。また検出期間も血清に比べ長期であったことより、解熱後の患者においてもウイルス遺伝子を検出できるため、ウイルス型別の診断に有用である。

また、尿中に感染性ウイルスが存在するかどうかに関しては、培養細胞を用いたウイルス分離を実施したが、ウイルスが分離されなかったことから、その可能性は低いものと考えられるが、発熱中はもちろん解熱後も尿や唾液の取り扱いにあたっては通常の基本的な注意が必要である。

チクングニヤ熱は、臨床的にはデング熱と類似した急性熱性疾患であるが、我々の確立したウイルス遺伝子検出法および IgM 抗体捕

捉 ELISA 法、中和抗体測定により、鑑別できることが確認された。

E. 結 語

デング熱症例の中に尿中や唾液中からウイルス遺伝子を検出できる症例が存在することが確認され、それらの症例ではウイルス血症が消退した後も、ウイルス遺伝子を検出できた。このことは、デング熱の病原体診断上非常に意義があり、今後積極的に実施すべきである。また、現在南アジア、東南アジアで流行しているチクングニヤ熱の実験室診断法を確立した。

F. 健康危険情報

2009 年に入り、マレーシアのチクングニヤ熱は第 8 週現在 964 症例であり、シンガポールでは 211 症例と急増し、タイにも流行は波及している。

G. 研究発表

1. 論文発表

水野泰孝、加藤康幸、工藤宏一郎、高崎智彦、倉根一郎。遷延する関節痛より確定診断に至ったチクングニヤ熱の本邦初症例。感染症学雑誌 81:600-601 (2007)

Y. Mizuno, A. Kotaki, F. Harada, S. Tajima, I. Kurane, T. Takasaki. Confirmation of dengue virus infection by detection of dengue virus type 1 genome in urine and saliva but not in plasma. *Trans. Royal Society Trop. Med. Hyg.* 101:738-739 (2007)

Ito M, Yamada K, Takasaki T, Pandey B, Nerome R, Tajima S, Morita K, Kurane I. Phylogenetic analysis of dengue viruses isolated from imported dengue patients: possible aid for determining the countries where infections occurred. *J Travel Med.* Jul-Aug;14(4):233-44 (2007).

Tajima S, Nukui Y, Takasaki T, Kurane I. Characterization of the variable region in the 3' non-translated region of dengue

type 1 virus. *J Gen Virol.* 88:2214-22 (2007).

Tajima S, Takasaki T, Kurane I. Characterization of Asn130-to-Ala mutant of dengue type 1 virus NS1 protein. *Virus Genes.* 36:323-329 (2008)

Dewi BE, Takasaki T, Kurane I. Peripheral blood mononuclear cells increase the permeability of dengue virus-infected endothelial cells in association with downregulation of vascular endothelial cadherin. *J Gen Virol.* 89:642-652 (2008)

2. 学会発表

Meng Ling Moi, Chang-Kweng Lim, Tomohiko Takasaki, Ichiro Kurane. Determination of the regions in human FcγRIIA receptor responsible for the antibody dependent enhancement in dengue virus infection. The seventh Japan-China International Conference of Virology. June 1-3, 2008. (Tokyo)

Takasaki Tomohiko, A. Kotaki, S. Tajima, T. Hirayama, Y. Mizuno, N. Takeshita, I. Kurane. Diagnosis of dengue virus infection by detection of dengue virus genome in urine and saliva. The second international conference on dengue and dengue haemorrhagic fever (Phuket, Thailand) 2008. October.

大松勉、平山隆則、小滝徹、伊藤美佳子、片貝裕子、中村紳一朗、明里宏文、高崎智彦、倉根一郎。マーマセットを用いたデングウイルス感染モデルの構築。第 56 回日本ウイルス学会学術集会。Oct. 26-28.2008(岡山市)

高崎智彦。昆虫媒介感染症～デング熱を中心に～。第 23 回 Transfusion Medicine Conference. 2009 年 1 月 31 日 (神奈川県葉山町)

高崎智彦、林昌宏。チクングニヤウイルス

感染症の実験室診断法. 平成 18 年度希少感
染症診断技術研修会. (東京) 2007 年 2 月.

1. 特許取得
なし

高崎智彦、林 昌宏、小滝 徹、水野泰孝、
加藤康幸、工藤宏一郎、渡邊 香奈子、倉
根一郎. チクングニヤ熱輸入 2 症例と実験
室診断法. 第 42 回日本脳炎ウイルス生態学
研究会 (石川県白山市) 2007 年 5 月.

2. 実用新案登録
なし

3. その他
なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）
分担研究総合報告書

蚊類のアルボウイルス感受性、大分県下のアルボウイルス媒介蚊調査、およびタイ国での
デング熱媒介蚊調査に関する研究

研究分担者	江下優樹大分大学医学部感染分子病態制御講座・准教授
研究協力者	高崎智彦国立感染症研究所ウイルス1部・室長
	Raweewan Srisawat Mahidol University, Thailand
	Narumon Komalamisra Mahidol University, Thailand
	Yupha Rongsriyam Mahidol University, Thailand
牧野芳大	大分大学医学部感染分子病態制御講座・教授
川越和四	イカリ消毒（株）・環境衛生担当
菊屋恵理子	大分イカリテクノス（株）・技術担当
野村英俊	大分イカリテクノス（株）専務取締役
菊屋奈良義	大分イカリテクノス（株）・代表取締役
船津良生	日東防疫（有）・代表取締役
河野健二	日東防疫（有）消毒担当
阿部秀高	日東防疫（有）消毒担当
長野晴雄	コクエイ消毒（有）代表取締役
長野千恵美	コクエイ消毒（有）衛生害虫防除
長野雄樹	コクエイ消毒（有）衛生害虫防除
小河正雄	大分県衛生環境研究センター
水田英生	大阪検疫所・企画調整官
井村俊郎	神戸検疫所・課長
内田幸憲	神戸検疫所・所長
牛島廣治	鹿児島国際大学・教授
高島郁夫	北海道大学大学院獣医学研究科公衆衛生学教室・教授
小林睦生	国立感染症研究所昆虫医学部・部長
倉根一郎	国立感染症研究所ウイルス1部・部長

研究要旨 日本産ヤマトヤブカのウエストナイルウイルス感受性を明らかにした。アカイエカの日本脳炎ウイルス感受性は、チカイエカ、トウゴウヤブカ、ヤマトヤブカより高いことが示唆された。日本脳炎ウイルス株4種を接種したアカイエカでは、ワクチン株よりも36～510倍程高い力価が他3株で認められた。経口感染アカイエカでは、ワクチン株とJath16株と同程度の増殖であったのに対して、JaGAR01株は2倍ほど、三重株は10倍ほどの高いウイルス力価が認められた。希釈したウイルスに経口感染した蚊では、個体間でウイルス増殖のパラツキが大きくなり、系統間にも差として現れた。

ライトトラップを用いて大分県下のアルボウイルス媒介蚊調査を行った。ドライアイスを使用したCDCライトトラップで、牛舎で多数のコガタアカイエカとシナハマダラカを2006年8月に採集した。2006年から2008年の採集個体数は、漸次少なくなる傾向にあった。

デング熱流行時期のタイにおいて、デング熱患者宅内におけるウイルス保有蚊を調査した。患者宅で採集したネッタイシマカから異なる年度にデングウイルス2型と4型を分離した。患者宅のウイルス感染蚊の割合は、年毎に変動したが、10～50%の蚊が感染していた。

感染蚊の一部は、患者宅から近隣の家に移動していることが示唆されたことから、二次患者発生を阻止するために早期感染蚊検出のためのモデルを提案した。

A. 研究目的

1. 蚊のアルボウイルス感受性に関する研究目的

我国のウエストナイルウイルス媒介蚊の蚊種を探索するために、ヤマトヤブカの感受性試験を検討した。また、日本脳炎ウイルス媒介可能なアカイエカを含む日本産蚊類を用いて、ウイルス系統株による感受性を検討して、適切な防除対策の基礎資料を得ることを目的として感染実験を行った。

2. 大分県下のアルボウイルス媒介蚊調査に関する目的

大分県下でのアルボウイルス媒介蚊の動態を知るために、蚊の活動のモニタリング調査を実施した。

3. デング熱流行地タイでの媒介蚊調査の目的

蚊のデングウイルス感染状況を調べて、患者発生前のサーベイランスに適用可能かどうか、また、ウイルス潜伏箇所としての患者宅の疫学的意義を検討するために、タイ国でのデングウイルス感染蚊の実態調査を患者宅で実施した。

B. 研究方法

1. 蚊の日本脳炎ウイルス感受性に関する研究方法

ウイルス： ウエストナイルウイルスには、ニューヨーク株を用いた。日本脳炎ウイルスとしては、北京株、日本国内で分離された JaGAR01 株(蚊から分離)、JaTh160 株、および三重株(ブタから分離)を用いた。正式に分与されたウイルスは、大分大学で必要量のストックウイルス液を作製後、分注して-80℃に保管した。また、ヤマトヤブカは野外から採集した蚊を用いた。アカイエカは、大阪で採集されたものを大日本除虫菊(株)から譲り受け、大分大学の飼育施設で継代飼育しているものを使用した。チカイエカ、トウゴウヤブカの蚊種は、実験室内で経代飼育中の蚊を用いた。

蚊の感染：羽化後1週間程の未吸血のアカイエカ *Culex pipiens pallens* 雌成虫、チカイエカ *Culex pipiens molestus*、ヤマ

トヤブカ *Ochleloratus japonicus* を用いた。蚊の経口感染では、PBS(-)液で2回洗ったヒト赤血球に等量のウイルス液を加えた液に最終濃度2%の蔗糖を加えて、蚊に与えた。経口感染で取り込んだ吸液量を約3.3ulとして、蚊個体毎のウイルス力価をPAP法で算出した。また、蚊の接種感染では、ウイルス液を0.2ul接種した。その後、8日間28℃で飼育した。その間4%砂糖水を含む綿を蚊に与えた。ハーベストした蚊は、ウイルス力価を個別に測定するまで、-80℃に保管した。

PAP試験：アカイエカ1個体毎に150ulの2%FBS含MEMを加えてホモジナイズした。その遠心(2,500rpm、10分、4℃)上澄みの濾過液(0.22um、ミリポアー社製)を、10倍段階希釈した後に、Vero細胞に接種して、PAP試験を行った。日本脳炎ウイルスに対するウサギ免疫血清を使用した。なお、PAP試験には、陽性および陰性の対照区を毎回設定した。蚊の濾過液によるウイルスの増殖程度は、Vero細胞上に抗体で染色した細胞のフォーカス数で定量をおこない、FFU/mlで算出した。

2. 大分県下の媒介蚊調査

ライトトラップを用いて大分県下のアルボウイルス媒介蚊調査を行った。ドライアイス、あるいは小型炭酸ガスボンベを用いたライトトラップを用いて、人家周辺、牛舎で蚊の採集を行った。

3. デング熱媒介蚊調査の方法

タイにおいて、デングウイルス媒介蚊の調査を行った。現地において、デング熱患者情報を当日の午前バンコク市近郊の担当地区衛生部で得た後、殺虫剤を散布チームと一緒にデング熱患者宅を訪問して、蚊成虫・幼虫を採集した。患者宅で採集した蚊をマヒドン大学研究室に持ち帰り、蚊成虫は約7日間、幼虫は老齢幼虫まで飼育して-80℃に保管した。採集後所定日数を経過したネッタイシマカ雌成虫は、40ulの4%FBS含MEM液を蚊一個体毎に加えてホモジナイズした遠心上澄みを用いて、デングウイルスゲノムの検出および血清型判定

のために RT-PCR 法を行った。

(倫理面への配慮)

ウエストナイルウイルスは、北海道大学獣医学部から、また、日本脳炎ウイルスは国立感染症研究所から大分大学医学部に分与されたものである。また、大分大学医学部附属動物実験施設内での蚊の飼育および感染実験に関して、大分大学医学部動物実験委員会から承認を得た。

C. 研究結果

1. 蚊のアルボウイルス感受性

ヤマトヤブカは、ウエストナイルウイルスに感受性を持つことを証明した。日本脳炎ウイルス株 4 種を接種したアカイエカでは、ワクチン株よりも 36~510 倍程高い力価が他 3 株で認められた。高濃度のウイルス液を経口摂食した蚊では、いずれの株でも同程度の感染が成立したが、低濃度のウイルス液の場合は、蚊個体間に感染の差が認められ、株間にも差となった。アカイエカの日本脳炎ウイルス感受性は、チカイエカ、トウゴウヤブカ、ヤマトヤブカのそれらより高いことが示唆された。

2. 大分県下のアルボウイルス媒介蚊調査

ドライアイスまたは、ミニ炭酸ガスポンプを使用した CDC ライトトラップでの蚊捕虫を実施した。牛舎で多数のコガタアカイエカとシナハマダラカを 2006 年 8 月に採集した。3 年間の採集蚊数は、2008 年度が最も少なかった。

3. デング熱流行地タイでの媒介蚊調査

デング熱患者宅で採集したネッタイシマカからデングウイルス 2 および 4 型を分離した。患者宅のウイルス感染蚊の割合は、年毎に変動していたが、約 5~50%であった。感染蚊の一部は、患者宅から近隣の家に移動していることが示唆された。

D. 考察

1. 蚊のアルボウイルス感受性

経口感染後 14 日間を経過した蚊の日本脳炎ウイルス力価について、各株とも 2 個体について検討した。その結果は、蚊の感染率は、ウイルス取り込み量が少なくなると感染率が低下した。この傾向は、4 株ともに認められた。蚊 1 個体が取り込んだウイルス量が約 3.3×10^4 の 4 乗程度で、50%

の感染蚊が得られた。しかし、さらに 10 倍薄いウイルス量では感染は成立しなかった。

次に、10 の 5 乗から 6 乗を取り込んだ蚊での 14 日後のウイルス力価を調べたところ、いずれの株でも、ほぼ 3×10^6 の 6 乗までウイルスは増えていた。しかしながら、50% 感染率をしめしたウイルス量つまり 3.3×10^4 の 4 乗では、感染が成立した蚊個体間でのウイルス量のバラツキと同様に、株間でも差が認められた。蚊から分離された JaGar01 株は、薄い濃度のウイルスでも感染しやすい株と思われた。反対に、ワクチン株は蚊体内では増えにくい株といえよう。アカイエカ、チカイエカ、ヤマトヤブカの順にウイルスの増殖は低くなるように推察された。また、アカイエカの接種法でも少ない量のウイルスを接種した場合は、蚊から分離された JaGRA01 株でウイルス増殖が多く、北京株では少ない傾向が認められた。

遺伝子型 I に属する三重株 (ブタから分離) に対するアカイエカの感受性は、日本国内で分離された遺伝子型 III に属する JaTh160 株と同程度であり、JaGar01 株 (蚊から分離) よりも低い値であった。ウイルスの分離歴・マウス継代歴などを考慮する必要があるが、ブタから分離された遺伝子型 1 の三重株はアカイエカに対してワクチン株よりも増殖性が比較的高いと言えよう。

2. 大分県下のアルボウイルス媒介蚊に関する考察

大分県では、豚からのウイルス分離が報告されているので、感染蚊の活動は十分に考えられる。

しかしながら、蚊の活動は県内の限られた箇所限定されているのかもしれない。

3. デング熱媒介蚊調査に関する考察

ネッタイシマカ雌成虫からデングウイルスゲノムが検出されたが、混合感染の可能性もある。また、2006 年の調査では、陽性蚊のいた家屋毎の陽性蚊の割合は採集総数の 10~50% を占めていたが、2007 年の調査では、蚊の陽性率は採集総数の 5~8% と低かった。デング熱患者数およびデングウイルス感染蚊の密度が年ごとに異なる事が示唆された。2008 年度は、雨期が 10 月まで伸びたが、そのぶん、従来の雨期には雨がさほど降っていないことから、蚊の発生

数が2008年は少ないように思われた。

3年間にデングウイルス2型と4型を蚊から分離した。2008年に採集した蚊からのウイルスゲノムは現在検討中であるが、1個体の蚊から複数のウイルスゲノムが検出された可能性があり、現在解析中である。2006-2008年にかけての媒介蚊調査を通じて、早期感染蚊検出のためのモデルを提案した。

E. 結論

1. アカイエカの感染率は日本脳炎ウイルス摂取量が多いほど高くなった。50%の蚊が経口感染するウイルス量は、アカイエカでは約 3.3×10^4 の4乗FFUであった。感染成立の閾値のウイルス量を経口摂取した蚊では、個体間のバラツキと株間で差が認められた。ウイルスを胸部接種したアカイエカ、チカイエカ、ヤマトヤブカのウイルス増殖は、この順位で低くなるように思われた。また、ヤマトヤブカでのウエストナイルウイルスの感受性を確認した。

2. 大分県内での蚊の活動を知るために、ライトトラップでの採集を行った。蚊からのウイルスの分離は陰性であった。

3. タイでのデング熱患者の発生は、散発的に出現する傾向が示唆されること、および感染蚊の隣家への移動が示唆されたことから、二次患者を未然に防ぐための感染蚊の迅速検出システムを提案した。

G. 研究発表

1. 論文発表

(1) Dieng, H., Boots M. and Eshita, Y. (2006): Some insights into the concept of body size in mosquitoes. *House and Household Insect Pest*, 28(1): 47-62.

(2) Dieng, H., Boots, M., Tamori, N., Higashihara, J., Okada, T., Kato, K. and Eshita, Y. (2006): Some technical and ecological determinants of hatchability in *Aedes albopictus*, a potential candidate for transposon-mediated transgenesis. *J. Amer. Mosq. Cont. Ass.* 22(3):382-389.

(3) Dieng, H., Boots, M., Higashihara, J., Satho, T., Kato, K., Okada,

T. Komalamisra, N., Ushijima, H., Takasaki, T., Kurane, I. and Eshita, Y. (2006): Two-dimensional gel analysis of midgut proteins of the dengue vector *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) with reference to sex and body size. *Jpn. J. Environ. Entomol. Zool.*, 17(4):133-141.

(4) 澤邊京子、佐々木年則、星野啓太、井澤晴彦、小滝 徹、伊藤美佳子、高崎智彦、江下優樹、小林睦生(2006):日本国内における蚊からのウエストナイルウイルス検出法の検討。衛生動物 57(4): 279-286。

(5) Dieng, H., Boots M. and Eshita, Y. (2006): Some insights into the concept of body size in mosquitoes. *House and Household Insect Pest*, 28(1): 47-62.

(6) Dieng, H., Boots, M., Tamori, N., Higashihara, J., Okada, T., Kato, K. and Eshita, Y. (2006): Some technical and ecological determinants of hatchability in *Aedes albopictus*, a potential candidate for transposon-mediated transgenesis. *J. Amer. Mosq. Cont. Ass.* 22(3):382-389.

(7) Dieng, H., Boots, M., Higashihara, J., Satho, T., Kato, K., Okada, T. Komalamisra, N., Ushijima, H., Takasaki, T., Kurane, I. and Eshita, Y. (2006): Two-dimensional gel analysis of midgut proteins of the dengue vector *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) with reference to sex and body size. *Jpn. J. Environ. Entomol. Zool.*, 17(4):133-141.

(8) Jose D. J. Diaz Aquino, Wei-Feng Tang, Ryoichi Ishii, Tetsuro Ono, Yuki Eshita, Hiroshi Aono and Yoshihiro Makino (2008): Molecular epidemiology of dengue virus serotypes 2 and 3 in Paraguay during 2001- 2006: The association of viral clade introductions with shifting serotype dominance. *Virus Res.* (2008), doi:10.1016/j.virusres.2008.07.011

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

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）
分担研究総合報告書

日本脳炎ウイルスの病原性に関する研究

研究分担者 倉根一郎（国立感染症研究所ウイルス第一部 部長）
研究協力者 田島 茂（国立感染症研究所ウイルス第一部 主任研究官）
高崎智彦（国立感染症研究所ウイルス第一部第二室 室長）

研究要旨 過去3年間に我々は、1) 日本脳炎ウイルス (JEV) リバースジェネティクス法の確立、2) JEV Beijing-1株中の高病原性に関わる部位の同定、3) JEV Mie40株中の高病原性に関わる部位の同定を行ってきた。1) においてMie41株を用いて分子クローンの構築が完成した。これにより様々な変異JEVウイルスを作製することが可能となり、2)、3) の研究を遂行するための原動力となった。2) において、Beijing-1株のE領域の1アミノ酸がマウス病原性を規定することを明らかにした。さらに3) では、Mie40株のC領域の1アミノ酸およびNS4A領域の1アミノ酸が病原性を規定することを明らかにした。

A. 研究目的

日本脳炎ウイルス (JEV) の遺伝子型は5型に分類されるが、1990年代以降先島諸島を除く日本国内で主に同定・分離される JEV の遺伝子型は1型である。国立感染症研究所では2002年以降各地方の衛生研究所の協力の下、ブタ血清から JEV の分離をしているが、これまで分離されたものはすべて1型である。これら分離されたウイルスのうち5株についてマウス病原性解析を行なったところ、同じ1型であるにも関わらず病原性に顕著な差異が観察された。さらに当研究室で保持する3型 JEV が高病原性を示すことが明らかとなった。本研究でははじめに JEV の分子クローンを構築し、これを用いて病原性の差異を引き起こす要因の同定を試みた。

B. 研究方法

病原性を規定する部位を同定するために必要な JEV 分子クローンを構築し、JEV のリバースジェネティクスを確立した。構築のための親ウイルスとしては、低病原性を示す Sw/Mie/41/2002 (Mie41) 株を用いた (Nerome et al. J. Gen. Virol. 88: 2762-2768 (2007))。これよりウイルス RNA を合成し、Vero 細胞に導入することにより組換えウイルス粒子を得た。Mie41 と比較するウイルス株として、高病原性株である Beijing-1 (smb37) 株と Sw/Mie/40/2004 (Mie40) 株を用いた。これら2株と Mie41 株との組換えキメラウイルスを作製した。さらに部位を絞り込むため、様々な点変異ウイルスも作製した。病原性はマウス (ddY あるいは C3H/He 系統, 3週齢) の腹腔に各ウイルスを接種

し、3週間経過観察することにより判定した。

(倫理面での配慮等)

本研究における動物実験は、国立感染症研究所動物実験委員会により承認された。遺伝子組換え実験は文部科学大臣の承認を得て行なった(大18-7)。

C. 研究結果

1) JEV リバースジェネティクス法の確立
Mie41株の完全長 cDNA をプラスミド pMW119 に導入することにより、分子クローンを得た。これより RNA を合成後、Vero 細胞に導入することにより、ウイルス粒子の産生を確認した。これにより JEV のリバースジェネティクスが確立した。

2) JEV Beijing-1 株中の高病原性に関わる部位の同定

JEV の E 領域が病原性に関与するとの報告があることから、この E 領域 (EB1)、E 領域の N 側半分 (nEB1) および C 側半分 (cEB1) を Beijing-1 (smb37) に置換したキメラウイルスを作製し病原性を調べた。すると EB1 と nEB1 は Beijing-1 (smb37) と同等の病原性を示した。この E 領域内には Mie41 株と Beijing-1 (smb37) 株とでアミノ酸配列を比較したところ、4ヶ所のアミノ酸配列の差異(123番目、129番目、222番目、227番目)が存在していた。次にこれらそれぞれ単独の点変異体ウイルスを作製し、病原性を比較した。すると 123番目を Beijing-1(smb37)に置換したウイルスのみが Beijing-1(smb37)と同等の病原性を示した。以上より Beijing-1(smb37)の E123番目のアミノ酸(アルギニン)がマ

ウス病原性を規定することが明らかとなった。

3) JEV Mie40 株中の高病原性に関わる部位の同定

Mie40 株および Mie41 株の全塩基配列を決定したところ、計 7ヶ所のアミノ酸が異なっていた。また非翻訳領域については、3' 側が 6ヶ所が異なっていた。両者の差異をもとに 4種類の組換えキメラウイルス NS3-4A(Mie40) NS4B-5(Mie40), 3' NTR(Mie40),

CprME, NS3-3' NTR(Mie40) を作製し病原性を比較した結果、NS5 領域の 4ヶ所のアミノ酸置換および 3' NTR の塩基置換は病原性に関与しないことが明らかとなった。次に残り 3ヶ所のアミノ酸置換各々について点変異体を作製し同様に解析したところ、NS3 での変異は病原性に関与しないことが明らかとなった。一方 C 部位 (10番目) と NS4A (2126番目) 部位は各々単独で病原性に関与することが明らかとなった。10番目の部位は、アミノ酸がリジンの場合高病原性を示しアルギニンの場合は低病原性を示す。また 2126番目の部位は、パリンの場合は低病原性を示し、イソロイシンでは高病原性を示す。

D. 考察

JEV のリバースジェネティクス法を確立したことによって、マウスに対する病原性に関わる部位を同定することができた。この方法は病原性解析以外にも様々な解析に応用することが可能であり、今後も活躍してくれることと期待している。JEV3 型株である Beijing-1 における高病原性に関与するアミノ酸は E 領域内であったのに対し、Mie40 株についてはこれ

までの報告でも全く注目されていない部位であった。このことは非常に興味深い一方、メカニズムについては容易には想像がつかない。C 蛋白質はウイルス粒子へのウイルスゲノムのパッケージングに関与する構造蛋白質であるが、その他に核内に局在するとの報告がある。これらのことを踏まえ、病原性制御機構の解析を進めたい。非構造蛋白質である NS4A は疎水性アミノ酸を多く含むことから、膜蛋白質と考えられている。ウイルスのライフサイクルでは、主にゲノム複製に関与し、複製複合体の形成に関与するとの報告があるが、その機能解析はウイルス蛋白質の中で最も進んでいないものの 1 つである。しかし最近 NS4A が宿主側のインターフェロン系のシグナル伝達に影響する可能性が示唆されている。今後この経路に焦点を当てて解析を進めてゆきたい。E123 番目については、細胞への吸着効率の差異である可能性が高い。他のフラビウイルス研究において、糖脂質を介した細胞への吸着などの報告がある。今後はこのような分子とウイルス粒子の相互作用について解析を進めてゆきたい。

E. 結論

- 1) JEV 感染性分子クローンを構築し、リパースジェネティクス法を確立した。
- 2) JEV の E 蛋白質の 123 番目のアミノ酸置換がマウス病原性に寄与することが明らかとなった。
- 3) JEV のコア蛋白質の 1ヶ所 (10 番目) および NS4A 蛋白質の 1ヶ所 (2126 番目) のアミノ酸置換がマウスでの病原性に寄与することが明らかとなった。

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

田島茂、根路銘令子、高崎智彦、倉根一郎。日本脳炎ウイルス genotype1 完全長 cDNA クローンの作製とウイルス産生系の確立。第 41 回日本脳炎ウイルス生態学研究会 (平成 18 年 5 月)

貫井陽子、田島茂、小滝徹、根路銘令子、高崎智彦、倉根一郎。日本脳炎ウイルス genotype1 型完全長 cDNA クローンの作製とウイルス産生系の確立。第 54 回日本ウイルス学会学術集会 (平成 18 年 11 月)

田島茂、貫井陽子、根路銘令子、高崎智彦、倉根一郎。Genotype 間キメラウイルスを用いた日本脳炎ウイルスの性状解析。第 42 回日本脳炎ウイルス生態学研究会 (平成 19 年 5 月)

貫井陽子、田島茂、根路銘令子、林昌宏、高崎智彦、倉根一郎。日本脳炎ウイルスの病原性を規定するウイルス因子の同定。第 55 回日本ウイルス学会学術集会 (平成 19 年 10 月)

貫井陽子、田島茂、池田真紀子、小滝徹、加藤文博、根路銘令子、林昌宏、高崎智彦、倉根一郎。日本脳炎ウイルス非構造蛋白 NS4A の 1 アミノ酸変異は IFN β の誘導を低下させることにより病原性を高める。第 56 回日本ウイルス学会学術集会 (平成 20 年 10 月)

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

デングウイルス感染の抗体検査に関する研究
抗デング特異 IgA 抗体検出の有用性と
日本脳炎ウイルスとデングウイルス感染機構に関する研究

研究分担者	名和 優	埼玉医科大学 医学部 微生物学 講師
研究協力者	町田 早苗	埼玉医科大学 医学部 医学研究センター
	高崎 智彦	国立感染症研究所 ウイルス1部 室長
	田島 茂	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 部長
	水野 泰孝	国立国際医療センター
	加藤 康幸	国立国際医療センター

研究要旨 平成 18 年度より 20 年度の 3 カ年における研究で 1. IgA 抗体捕捉酵素免疫吸着測定法(IgA-ELISA)によるデングウイルス抗体検出法を確立し、日本人輸入感染例のみならず流行地台湾人デング患者の血清 IgA 抗体と IgM 抗体を解析し、血清 IgA 抗体が IgM 抗体検出より短期間に検出され感染様態を反映していることを示した。2. IgA-ELISA を用いて、日本人輸入デング症例での尿中、唾液中の IgA 抗体が検出され、出血熱を起こした患者における回復期での抗体診断の可能性を示唆した。3. 日本脳炎ウイルスの吸着・侵入の解析では C6/36 細胞は酸性条件では感染価が高くなり、ウイルスと細胞との融合が増強されることを示唆した。また、Vero 細胞をカルボキシルイオノフォア・モネンシンで Vero 処理し、JEV の吸着への影響をみたが、吸着を抑制しなかった。4. マウス樹状細胞とデングウイルス感染研究では、人での報告と同様に未熟な樹状細胞にデング 2 型ウイルスが感染し、感染後ウイルスが増殖していることを明らかにした。

A. 3 年間の研究結果と考察

1. 流行地台湾デング患者血清での IgA 抗体検出

節足動物媒介性新興ウイルス感染症の中でワクチン、治療法がないデングウイルス感染症の血清学的診断は、発熱後 5 日間程度の急性期では血清中よりデングウイルス RNA を検出して確定診断する。それ以後の回復期では、血清中の特異的 IgM 抗体検出で診断可能である。流行地台湾でのデング患者の IgA 抗体と IgM 抗体の解析で IgM 抗体が感染後 1 ヶ月以上検出される例があり、特異的 IgA 抗体検出の方が抗体消失も早期で感染様態を反映していることが分かった。

2. 尿中、唾液中の IgA 抗体検出

デング感染者のうち、デング出血熱を起こした患者からは採血が困難で血液以外の検体での診断が望まれる。尿及び唾液での IgA 抗体検出を目的とし、方法は血清 IgA-ELISA 検出法を応用し、交差反応が懸念される日本脳炎ウイルス IgA 抗体を同時に測定し検討した。非感染日本人の尿では抗デング IgA 抗体は検出されず、日本人輸入デング症例において 8 倍希釈で尿中および唾液での IgA 抗体が検出された。病日ごとに採取できた 8 症例中 4 症例で検出された。また、尿及び唾液での検出例では、5 病日以降の回復期で検出され、血清 IgA 抗体の動向と同様であった。日本人輸入デング症例において尿中および唾液での

IgA 抗体が検出され、診断に有用であると示唆した。

3. 日本脳炎ウイルス(JEV)の吸着と侵入に関する研究

(1)C6/36 細胞での pH 変動による解析

ヒトスジシマカ由来 C6/36 細胞では pH7.4 から pH6.4 までの弱酸性条件では JEV の感染価を示すプラーク数は減少したが、pH6.2 から pH5.8 までの酸性条件になると逆にプラーク数が増えた。酸性条件ではウイルスと細胞との融合が増強されることを示唆した。また、エンドサイトーシス抑制剤を用いた実験においても pH 変動によるプラーク数の増減パターンは変わらなかったが、プラーク数は減少し、JEV の C6/36 細胞への感染はエンドサイトーシスを介していることを示唆した。

(2)Vero 細胞での吸着と侵入

JEV の感染はレセプターの介在するクラスリン依存エンドサイトーシスだと示唆されているが、レセプターは同定されていない。レセプター同定を目的として Receptor-mediated endocytosis に影響を与えるカルボキシルイオノフォア・モネンシンで Vero 処理し、JEV の吸着への影響をみたが、吸着を抑制しなかった。モネンシンは細胞吸着を直接抑制しないことが判明した。

4. マウス樹状細胞(Dendritic cell: DC)での Dengue ウイルス感染機構に関する研究

Dengue ウイルスのワクチン開発、感染免疫を解析する上で自然免疫・獲得免疫に深く関係する樹状細胞の役割を明らかにする目的で BALB/c マウスと C57BL/6 との 2 系統のマウスを用いて脾臓と骨髄から DC を分離し、Dengue ウイルス 2 型を用いて感染させ、間接蛍光抗体法と RT-PCR 法で解析した。人での解析と同様に骨髄由来の未熟な DC に感染することが蛍光抗体法で認められた。また、感染 1 週間後の DC 培養上清にウイルス遺伝子が検出され、ウイルスが増殖していることが判明した。

【倫理面についての配慮】

本研究で用いた臨床材料の採取は、「疫学研究における倫理指針」に基づき、平成 18 年

5 月 30 日に国立感染症研究所医学研究倫理審査に申請・登録され、同意を得て採取された。材料提供者および家族の個人の尊厳及び人権の尊重、個人情報の保護に配慮して実施した。

B. 結論

1. Dengue 流行地での回復期の血清診断では IgA 抗体の検出が感染指標になり得ることを示唆した。
2. 日本人輸入感染例で尿中および唾液中の抗 Dengue IgA 抗体が検出され、血清採取不可例での補助的診断に利用できる可能性が判明した。
3. 日本脳炎ウイルスの C6/36 細胞への感染はエンドサイトーシスを介していることを示唆した。
4. BALB/c マウスと C57BL/6 マウスの骨髄中の未熟な樹状細胞に Dengue ウイルスが感染していることが明らかになった。

C. 研究発表

1. 論文発表

Nawa M, Pan C-Y, Tsai W-H, Chan C-D, Machida S, Takasaki T, Lim CK, Harn M-R, Kurane I: Evaluation of immunoglobulin A-capture enzyme-linked immunosorbent assay for serodiagnosis of dengue virus infection. *Dengue Bulletin*, 30 : 157-161, 2006.

Nawa M, Machida S, Takasaki T, Kurane I: Plaque formation by Japanese encephalitis virus bound to mosquito c6/36 cells after low pH exposure on the cell surface. *J J I D*, 60 : 118-120, 2007.

2. 学会発表

町田早苗, 名和 優, 山城 哲, 西園晃, 高崎智彦, 倉根一郎: マウス樹状細胞株 Jaws II 細胞を用いた Dengue ウイルス感染機構の解析. 第 54 回日本ウイルス学会学術集会, 平成 18 年 11 月 19-21 日, 名古屋.

名和 優, 町田早苗, 田島 茂, 原田文植, 高崎智彦, 倉根一郎, 水野泰孝, 加藤康幸: デングウイルス感染の抗体検査: 患者尿中における IgM, IgA 抗体検出, 第 13 回トガ・フラビ・ペスチウイルス研究会, 平成 19 年 1 月, 東京.

町田早苗, 名和 優, 高崎智彦, Ming-Rong Harn, 倉根一郎: 台湾でのデング感染診断における IgA 抗体捕捉 ELISA の評価. 第 42 回日本脳炎ウイルス生態学研究会, 平成 19 年 5 月 18-19 日, 白山市.

名和 優, 町田早苗: カルボキシル・イオノフォア, モネンシンで処理した Vero cell への日本脳炎ウイルスの吸着と侵入. 第 42 回日本脳炎ウイルス生態学研究会, 平成 19 年 5 月 18-19 日, 白山市.

名和 優, 町田早苗, 高崎智彦, 水野泰孝, 倉根一郎: デングウイルス感染の抗体検査: 患者尿中よりの IgA 抗体検出, 第 55 回日本ウイルス学会学術集会, 平成 19 年 10 月 21-23 日, 札幌.

E. 知的財産権の出願・登録状況

なし

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）
分担研究総合報告書

動物モデルを用いたマラリア重症化機構に関する研究

研究分担者 松本芳嗣（東京大学・大学院農学生命科学研究科・准教授）

研究協力者 三條場千寿（東京大学・大学院農学生命科学研究科・特任研究員）

研究要旨 熱帯熱マラリアに特徴的な脳性マラリアの発症機序は未だ不明である。本研究では実験的脳性マラリア発症リスザル脳組織を用いた病理学的解析により、内皮細胞の変性、血漿成分の浸出、非感染赤血球の漏出、さらには血管の破綻による輪状出血斑といった一連の病理学的変化が脳性マラリアの発症に伴って起こることを明らかにした。これらの病理学的変化は脳性マラリアで死亡した患者の脳組織においても観察され、脳性マラリアの発症に血液脳関門の破綻が深くかかわることを示唆し、脳性マラリアの発症予知に新たな視点を提供した。マラリア重症化の予知技術開発のためにバイオマーカーの探索は必須である。本研究ではマラリア重症化のバイオマーカーとして尿中肝臓型脂肪酸結合タンパク(L-FABP)に注目して検討を行った。ヒトL-FABP(hL-FABP)遺伝子を導入したトランスジェニックマウスを用い、マラリア感染の進行(原虫血症)に伴い尿中hL-FABP排出量が増加することを示した。これらの成果は、重症マラリアの早期診断法ならびに治療法の開発および患者管理に関する医療の向上に貢献することが期待できる。

A. 研究目的

熱帯熱マラリアは発熱、貧血、脾腫に加え、しばしば肺浮腫、腎不全、低血糖症等の合併症を伴い重症化し、意識障害や昏睡などの脳症状を呈した脳性マラリアの場合、適切な処置が施されなければ致死性である。しかし、熱帯熱マラリアにおいてみられる合併症の病態形成機序については未だ不明な点が多く残されている。脳性マラリアについては、古くから病理組織学的所見として、感染赤血球の血管内栓塞像(sequestration)や脳実質での輪状出血像(ring haemorrhage)が知られている。しかし、これらの病理像あるいは近年明らかにされつつある感染赤血球の内皮細胞への接着機構が脳性マラリアの発症とどのように関係するかはほとんどわかっていない。本

研究では脳性マラリア発症リスザルモデルを用いて病理学的解析を行ない、更に、得られた知見がヒトに外挿できるかを実証するためにヒト由来試料を用いて解析を行った。

マラリア重症化の予知、予防、診断および治療技術の開発のために重症化の指標となるバイオマーカーの探索は必須である。FABP(Fatty Acid-Binding Protein) familyに属する肝臓型脂肪酸結合タンパク(L-FABP)は14.4 KDの分子であり、微小循環阻害のバイオマーカーとして注目され始めている。そこでマラリア重症化のバイオマーカーとして尿中L-FABPに注目してマラリアにおけるバイオマーカーとしての可能性を検討した。

B. 研究方法

[脳性マラリア発症機序の解明]原虫は熱帯熱マラリア原虫 *Plasmodium falciparum* Indochina-I/CDC 株、実験動物はボリビア型リスザルを用いた。感染リスザル赤血球 10^9 個を6頭のリスザルに静脈内接種した。リスザルは安楽死後剖検に供した。昏睡を来した後死亡したリスザルについては死亡直後に脳を含む各臓器を摘出し解析に用いた。採取したリスザルの脳を用い、病理学組織学的解析、超微形態学的解析および免疫組織化学的解析を行った。

[L-FABP のバイオマーカーとしての有用性]原虫は Balb/c マウスに対して致死的な感染を惹起する *P. berghei* ANKA 株および、Balb/c マウスに対して一過性の原虫血症を起こした後自然消失する *P. chabaudi* を用い感染を行った。動物は Balb/c を遺伝的背景とするヒト L-FABP 遺伝子導入マウスを用いた。マラリア原虫感染赤血球接種後、感染マウスにおける末梢血感染赤血球率をギムザ染色血液塗抹標本により測定した。また、連日、尿を採取し、尿中 hL-FABP 濃度は ELISA (ヒト型 L-FABP 測定キット、IBL) により測定した。また、感染マウス腎臓の病理組織学的解析を行った。クロロキンによる治療は総量 35 mg/kg を5日に分け腹腔内投与することにより行った。

本研究における動物実験は、東京大学動物実験実施マニュアルに従い、東京大学大学院農学生命科学研究科動物実験委員会および同遺伝子組換え生物等委員会の承認を受けて行った。ヒト由来試料は、タイ国マヒドン大学熱帯医学部附属病院にて熱帯熱マラリアで死亡した患者より採取、保管され、同大学の承認を受け提供された脳組織のパラフィン包埋組織であり、東京大学大学院農学生命科学研究科・農学部ヒトを対象とする研究倫理審査委員会より承認を受けて使用し

た。

C. 研究成果

熱帯熱マラリア原虫感染赤血球 10^9 個を接種した6頭のリスザルは感染後8-12日まで感染赤血球率が20%以上に達し、8-15日までに全頭が昏睡を来した。3頭は死亡し、他の3頭は死亡前に安楽殺を行ない剖検した。脳組織の病理学的解析の結果、全頭に輪状出血像が観察された他、数個から十数個程度の赤血球が血管周囲に漏出した小規模な出血像が脳実質に広範囲に観察された。透過型電子顕微鏡による観察の結果、漏出した赤血球に隣接した血管の内皮細胞に小胞体およびミトコンドリアの空胞化など変性像が認められた。フィブリノゲンおよびIgGを標的抗原として免疫組織学的解析を行った結果、血管壁や血管周囲に広く拡散した反応像が観察された。また、切片標本上病理組織学的には異常が認められない血管周囲にも陽性反応が観察された。これら実験動物において認められた所見が脳性マラリアを発症した患者にも認められるかを検証するため、脳性マラリアで死亡した患者の脳組織を用いて解析を行った。その結果、リスザルで観察されたと同様、輪状出血像に加え、脳実質の広範囲にわたって小規模な赤血球血管外漏出が認められた。また、フィブリノゲン、IgGに対する抗体を用いた免疫組織学的解析の結果、リスザルと同様に、切片標本上漏出赤血球がみられない血管の周囲にも血管からの血漿成分の浸出を示す陽性反応が認められた。これらの所見は脳性マラリアにおいて脳の血管透過性の著しい亢進、あるいは内皮細胞の変性等、血液脳関門の何らかの異常あるいは破綻が起きていることを示唆している。

マラリア原虫 *P. berghei* ANKA 株接種後の

末梢血感染赤血球率は急激に上昇し、接種 7 日目には 49.43% に達した。尿中 hL-FABP 量は接種前で 17 ng/ml、であったものが、感染の進行に伴い増加し、接種 5 日目で 187 ng/ml、接種 7 日目では 631 ng/ml に達した。これらの結果は感染の進行に伴い尿中への hL-FABP の排出が著しく亢進したことを示している。非致死的なマラリア原虫 *P. chabaudi* 接種後末梢血感染赤血球率は原虫接種 4 日目より上がり始め、接種 10 日目に最も高い値を示した (29.1%)。その後、感染赤血球率は下がり始め、接種 12 日目に 8.58%、接種 14 日目で 0.9%、感染 20 日目で 0% となった。尿中 hL-FABP 量は接種前で 5.9 ng/ml、接種 10 日目で感染赤血球率同様、5801.6 ng/ml と最も高い値を示した。その後、尿中 hL-FABP 量は下がり始め接種 12 日目で 26.3 ng/ml、接種 14 日目で 24.7 ng/ml、接種 20 日目で 4.8 ng/ml と感染赤血球率の増減と一致した。致死的なマラリア原虫 *P. berghei* ANKA 株接種後 7 日目にクロロキンによる治療を行ったところ治療群の感染赤血球率は治療開始翌日より急激に減少し、それに伴い尿中 hL-FABP 量も急激に減少した。これらの結果は尿中 hL-FABP がマラリア重症化を示すバイオマーカーとして有用であることを示唆している。

D. 考察

感染赤血球の血管内栓塞像 (sequestration) や脳実質での輪状出血像 (ring haemorrhage) に加え、非感染赤血球の漏出像および血漿成分の浸出像が脳性マラリア患者に見られる顕著な病理学的所見の一つであることを示した。これらの結果は脳性マラリアにおいて脳の血管透過性の著しい亢進、あるいは内皮細胞の変性等、血液脳関門の異常あるいは破綻が起きていることを示唆している。すなわち、血漿成分の浸出、

血液脳関門の異常を検出することによる脳性マラリア早期診断法の可能性を示唆している。ヒトでは L-FABP は腎臓において近位尿細管上皮細胞において産生され、一部は尿中に排出される (Kamijo, A. et al., 2004)。また、腎毒性薬剤や虚血などのストレスによって近位尿細管細胞の L-FABP 発現が増加することが報告されている (Nakamura, T. et al., 2007)。本研究により得られた結果は尿中 hL-FABP 量がマラリアにおける原虫血症と相関することを示し、マラリア重症化を示すバイオマーカーとして有用であることを示唆した。尿中バイオマーカーは重症マラリア診断のための新たな非侵襲的検査法としての有用性も期待できる。

E. 結論

脳性マラリア発症リスザルモデルを用い、脳性マラリアが血液脳関門の異常、破綻が深く関与することを示し、同様の所見が脳性マラリアで死亡した患者の脳においても認められることを示した。脳性マラリアの発症における血液脳関門の関与は脳性マラリアの病態形成機序論に新たな一説を提供する。また、ヒト肝臓型脂肪酸結合タンパク (hL-FABP) 遺伝子導入シマウスを用い、マラリア感染の進行に伴い尿中 hL-FABP 量が増加することを示した。マラリア特異的診断法と併用することにより、尿中 hL-FABP がマラリア重症化の早期予知、治療の判定に有用なバイオマーカーであることを示唆している。今後マラリア患者の尿中 hL-FABP 量と重症度との関連を明らかにすることにより、我が国におけるマラリア患者の予後の判定および治療に大きく貢献できるものと考えられる。