

陽性コントロールを同時に測定し、吸光度が 1.0 となるように各検体の吸光度を補正した値を ELISA 値として表した。

免疫染色法による DENV-NS1 抗体測定：DENV 各型の NS1 遺伝子を CHO 細胞に導入して得られた NS1 連続発現細胞を抗原として、階段希釈した被検血清、ビオチン化抗マウスあるいは抗ヒト IgG、ABC 試薬、VIP 試薬（ベクター社製）を順次反応させた。細胞には、遺伝子導入されて NS1 抗原を発現する細胞と、導入されずに発現していない細胞の両者が含まれるため、抗原発現細胞と非発現細胞の染色強度の違いが顕微鏡下で確認できれば陽性反応とみなした。陽性反応を示す最大の血清希釈度を、NS1 抗体価とした。

（倫理面への配慮）

本研究におけるヒト血清の使用は、神戸大学大学院医学研究科医学倫理委員会において承認された。また、動物実験は、神戸大学動物実験委員会により承認された。

C. 研究結果

過剰免疫ウサギ血清を用いた予備的検討：2D5 抗体がブロッキング ELISA 法に適する抗体かどうかを調べるために、JEV-NS1 過剰免疫ウサギ血清と非免疫ウサギ血清の阻害率を比較した（図 2）。1:20 から 1:320 までの濃度範囲で、両検体の阻害率に大きな差が認められた。免疫血清では 1:320 においても約 50%の阻害率を示したが、阻害率は濃度依存的に約 70%から低下した。また、非免疫血清では阻害率は 20%未満であった。この結果は、2D5 抗体を用いるブロッキング ELISA が、血清中の JEV に対する特異抗体の存在を識別できることを示す。

過剰免疫マウス血清を用いた特異性の検討：DENV-NS1 抗体による交差反応の影響を調べるために、DENV1-4 型のそれぞれの NS1 抗原により過剰免疫したマ

ウスの血清を用いてブロッキング ELISA で阻害率を測定し、JEV 免疫マウスおよび非免疫マウスの血清検体と比較した（図 3）。JEV 免疫マウス血清が約 70%~80%の阻害率を示したのに対して、DENV1-4 型 NS1 免疫マウス血清による阻害率は 30%未満であった。この結果は、ブロッキング ELISA 法は DENV-NS1 抗体による交差反応の影響を受けず、偽陽性の結果を生じにくいことを示す。

ヒト血清を用いたブロッキング ELISA のカットオフ値：JEV に対する中和抗体は陰性であり、黄熱ワクチン接種歴や海外渡航歴の無い米国健常人血清 20 検体を、JEV 抗体フリーの血清とみなして測定した（図 4）。阻害率の平均は 9.8%、また標準偏差は 7.0%であった。今回、暫定的に平均+3SD である 30.8%をカットオフ値とした。

ブロッキング ELISA の特異性：JEV-NS1 抗体および DENV-NS1 抗体の陽性・陰性を基準に分類した 4 つのグループにおけるブロッキング ELISA による阻害率を比較した。DENV-NS1 抗体陽性の検体はフィリピン人血清から、陰性の検体は日本人血清から選択した。DENV-NS1 抗体の選択には DENV-NS1 発現細胞を抗原とした免疫染色により、JEV-NS1 抗体の選択には JEV-NS1 を抗原とした ELISA 法を用いた。JEV-NS1 に対して陽性であるグループには、JEV-NS1 抗体強陽性の検体を用いた。図 5 に示すように DENV-NS1 抗体の存在に関わらず、JEV-NS1 抗体の有無によって阻害率に差が認められた。この結果は、ブロッキング ELISA 法が、ヒト血清においてもマウス血清と同様に DENV-NS1 抗体による偽陽性反応を生じにくいこと、すなわち DENV-NS1 抗体が含まれるヒト血清中において JEV-NS1 抗体を特異的に検出できることを示す。

ブロッキング ELISA の感度：ブロッキング ELISA は、阻害する抗体の無い条件で得られた吸光度からの減少で結合阻害を見る方法である。阻害抗体が存在しない条件と存在する条件の両者で得られる比較的高い吸光度の実験誤差が反映されるため、陽性検体を陰性検体から識別するカットオフ値が高く設定されることにより、検査法としての感度は低下することが予想される。今回のブロッキング ELISA の感度を評価するために、66 検体の日本人血清で得られた阻害率を、コンベンショナル ELISA により求められた NS1 抗体値と比較した（図 6）。NS1 抗体値が陰性（0.185 未満）の 20 検体はすべて阻害率も陰性であり、NS1 抗体値が 0.4 以上の 13 検体はすべて阻害率も陽性であった。しかし、NS1 抗体値が 0.185 から 0.4 の 33 検体のうち、20 検体（61%）は阻害率が陰性であった。この結果は、ブロッキング ELISA はコンベンショナル ELISA より感度が低いが、NS1 抗体が中等度以上の陽性検体はブロッキング ELISA でも陽性と判定されることを示す。

D. 考察

ブロッキング ELISA は、感染を受けた個体に誘導される特異抗体の抗原への結合、及びその結合による特異モノクローナル抗体の結合阻害を指標にする抗体測定法である。フラビウイルス属のウイルスは血清学的交差反応性が高いため、感染を受けた個体には交差性抗体も誘導される。すなわち、1 種のフラビウイルスに感染した場合でも、誘導される抗体は他種のフラビウイルス抗原にも反応する。特に、2 次免疫応答が関与すると、感染したフラビウイルスを特定することが、通常血清学的検査法では困難になることがある。

コンベンショナル ELISA は、固層化した抗体に結合する抗体量を測定するため、

結果は定量的である。しかし、特異抗体の抗原への結合とともに交差性抗体の結合も反応結果に反映されるため、フラビウイルス抗体を鑑別する目的には適さない。一方、ブロッキング ELISA は定量という観点からは優れた方法とはいえないが、抗原分子上の特異エピトープが交差性エピトープと位置的にある程度離れていれば、交差性抗体の存在は理論的には反応結果に影響せず、鑑別には適した方法と考えられる。

これまでに報告されたブロッキング ELISA では、比較的高い 1 点の血清濃度（1:5 や 1:10）が用いられてきた。特異モノクローナル抗体の結合阻害を指標にするため、高濃度の被検血清を用いなければ、血清中の抗体濃度が低い場合には阻害が起こらないためである。少しの阻害が起こったとしても、前述のように高い吸光度における実験誤差が避けられないため、その少しの阻害により検体を陽性と判断することは難しい。したがって、ブロッキング ELISA は NS1 抗体の検出においてはコンベンショナル ELISA より感度は低くなる。

本研究において、NS1 抗体が弱陽性（NS1 抗体値が 0.185 以上 0.4 未満）である多くの検体に対して、ブロッキング ELISA は陽性と判断することができなかった。これは、ブロッキング ELISA の感度の低さを示す。コンベンショナル ELISA と比較した場合の、ブロッキング ELISA の潜在的な欠点であると思われる。しかし、NS1 抗体値が 0.4 以上（中等度陽性あるいは強陽性）の検体では、ブロッキング ELISA とコンベンショナル ELISA の定性的結果は一致した。

ブロッキング ELISA の鑑別能力は、マウス血清とヒト血清を用いて証明した。マウスにおいては過剰免疫血清、ヒトにおいてはデング流行地の住民からランダムに選んだ中からさらに NS1 抗体陽性者をス

クリーニングして、試験に供した。DENV 抗体の有無に関わらず、ブロッキング ELISA の結果は、JEV 抗体の有無に依存した。

ブロッキング ELISA は、複数のフラビウイルスが共存する地域における血清疫学調査に使用されている。これまでは、感度についての検討はあまり行なわれず、ウイルスの侵淫状況を他のウイルスに対する抗体の影響を受けることなく、定性的に調査する目的で使用されてきた。特異抗体を正確に識別できるが感度がやや低いために、ブロッキング ELISA で求められた陽性率は低く見積もられることになる。本研究で用いられた日本人血清における NS1 抗体値分布と同様の、すなわち弱陽性から強陽性者の割合が類似の集団では、ブロッキング ELISA で求められた陽性率の約 2 倍が実際の陽性率であることが推定される。

本研究では、ブロッキング ELISA により、JEV 抗体が DENV 抗体から識別可能であることを示した。同時に、これまではあまり指摘されなかった感度について解析し、弱陽性の NS1 抗体ではブロッキング ELISA に捉えられないことがあることも示した。しかし、中等度以上の陽性検体であれば検知可能であり、さらに DENV 抗体の影響を受けないため、デング流行地における JEV の血清疫学に、ブロッキング ELISA は有用であると考えられる。

E. 結論

日本脳炎ウイルス抗体をデングウイルス抗体から識別するブロッキング ELISA 法が確立できた。

F. 健康危険情報

特記すべき事項なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

Konishi E, Sakai Y, Kitai Y, Yamanaka A: Prevalence of antibodies to Japanese encephalitis virus among inhabitants in Java Island, Indonesia, with a small pig population. *Am J Trop Med Hyg.* 2009;80(5):856-61.

Yamanaka A, Konishi E: A simple method for evaluating dengue vaccine effectiveness in mice based on levels of viremia caused by intraperitoneal injection of infected culture cells. *Vaccine.* 2009;27(28):3735-43.

Konishi E, Kitai Y: Detection by ELISA of antibodies to Japanese encephalitis virus nonstructural 1 protein induced in subclinically infected humans. *Vaccine.* 2009;27(50):7053-8.

Konishi E: Status of natural infection with Japanese encephalitis virus in Japan: prevalence of antibodies to the nonstructural 1 protein among humans and horses. *Vaccine.* 2009;27(50):7129-30.

Konishi E, Tabuchi Y, Yamanaka A: A simple assay system for infection-enhancing and neutralizing antibodies to dengue type 2 virus using layers of semi-adherent K562 cells. *J Virol Methods.* 2010;163(2):360-7.

Yamanaka A, Mulyatno KC, Susilowati H, Hendrianto E, Utsumi T, Amin M, Lusida MI, Soegijanto S and Konishi E: Prevalence of Antibodies to Japanese Encephalitis Virus among Pigs in Bali and East Java,

Indonesia, 2008. Japanese Journal of Infectious Diseases 2010 in press.

2. 学会発表

山中敦史、Eryk Hendrianto、Amor P Ginting、Dian Dwi Sary、Soegeng Soegijanto、小西英二：インドネシアのデング熱・デング出血熱患者における血清中の総補体価CH50の測定。第44回日本脳炎ウイルス生態学研究会、2009年6月

北井陽子、原田誠也、西村浩一、田部井由紀子、小西英二：NS1抗体測定による近年の日本脳炎ウイルス自然感染率の調査。第44回日本脳炎ウイルス生態学研究会、2009年6月

桑原三和、小西英二：昆虫細胞由来フラビウイルス蛋白の診断およびワクチン抗原への適用。第44回日本脳炎ウイルス生態学研究会、2009年6月

Atsushi Yamanaka, Yuko Tabuchi, Eryk Hendrianto, Amor P Ginting, Dian Dwi Sary, Soegeng Soegijanto, and Eiji Konishi: Development of a method to measure both infection-enhancing and neutralizing antibodies against dengue virus, and its application to clinical samples. The 9th Awaji International Forum on Infection and Immunity, Hyogo, 2009年9月

Atsushi Yamanaka, Eryk Hendrianto, Amor P Ginting, Dian Dwi Sary, Soegeng Soegijanto, and Eiji Konishi: Relationship between complement activity and disease severity in dengue fever and dengue hemorrhagic fever patients in Indonesia. The International Joint Forum on Infectious Diseases,

Bangkok, 2009年9月

山中敦史、Kris Cahyo Mulyatno、Helen Susilowati、Eryk Hendrianto、Takako Utsumi、Mochamad Amin、Maria Inge Lusida、Soegeng Soegijanto、小西英二：2008年インドネシアのバリ及び東ジャワ州の飼育ブタを対象とした日本脳炎抗体保有状況調査。第16回トガ・フラビ・ペスチウイルス研究会、2009年10月

田淵裕子、山中敦史、小西英二：準接着系K562細胞を用いたデング2型ウイルスに対する感染増強活性及び中和活性の同時測定法。第16回トガ・フラビ・ペスチウイルス研究会、2009年10月

山中敦史、Eryk Hendrianto、Amor P Ginting、Dian Dwi Sary、Soegeng Soegijanto、小西英二：インドネシアのデング熱・デング出血熱患者における補体活性と重症化の関係。第57回日本ウイルス学会学術集会、2009年10月

宮川優子、小西英二：デングワクチンがマウスに誘導する中和及び感染増強抗体の解析。第57回日本ウイルス学会学術集会、2009年10月

小西麻由、小西英二：日本脳炎ウイルス抗体をデングウイルス抗体から識別するブロッキングELISA法の確立。第57回日本ウイルス学会学術集会、2009年10月

瀧澤山人、小西英二：デング2型ウイルスによる前免疫がデング4価DNAワクチンの免疫原性に及ぼす影響。第57回日本ウイルス学会学術集会、2009年10月

田淵裕子、山中敦史、小西英二：デング流行地のヒトが保有するデングウイルス感

染増強抗体の解析。第57回日本ウイルス
学会学術集会、2009年10月

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

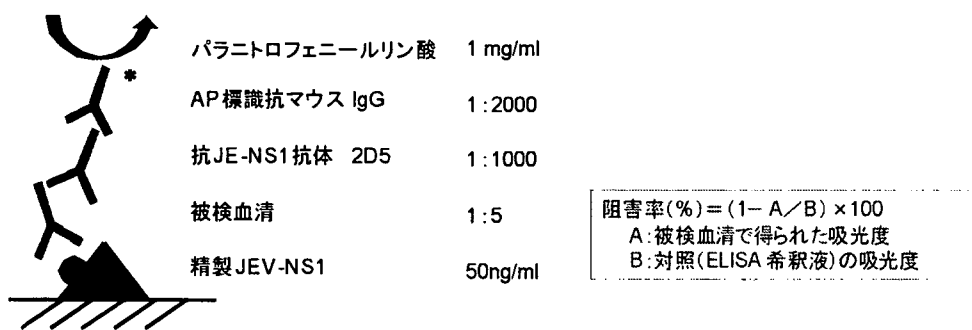


図 1. 日本脳炎ウイルス抗体をデングウイルス抗体から識別するブロッキング ELISA 法。プレートウェルに精製 JEV-NS1 抗原を固相化し、被検血清、JEV-NS1 に対する特異抗体である 2D5 を反応させた。次いで 2D5 の結合を検出するために、アルカリフォスファターゼ標識抗マウス IgG 抗体、さらに基質であるパラニトロフェニールリン酸を反応させて吸光度を測定した。血清添加による反応阻害率は、被検血清の代わりに ELISA 希釈液のみを添加した対照で得られた吸光度を 100% として、右に示す計算式により求めた。

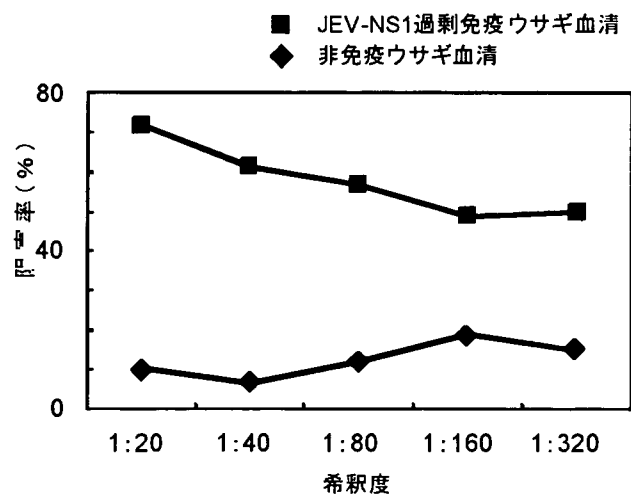


図 2. ブロッキング ELISA の予備的検討。JEV-NS1 過剰免疫ウサギ血清 (四角) と非免疫ウサギ血清 (菱形) の阻害率を比較した。横軸は血清の希釈度、縦軸はブロッキング ELISA 法で求められた阻害率を%で示す。

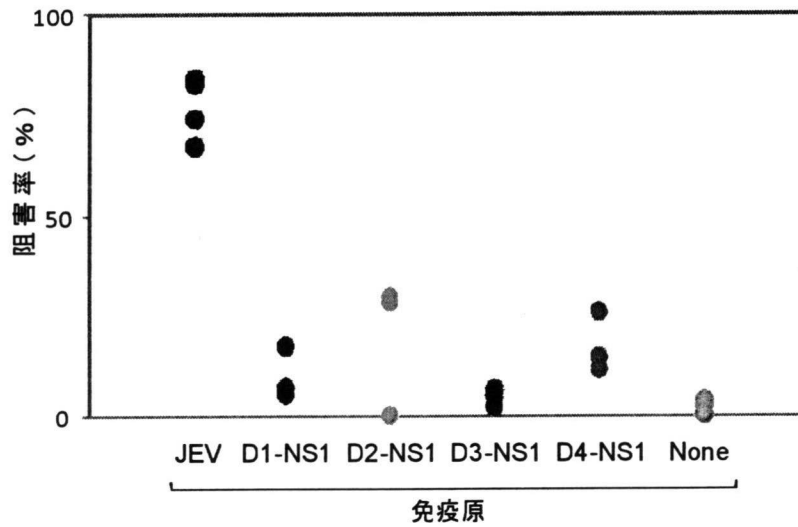


図 3. 抗 DENV-NS1 マウス過剰免疫血清のブロッキング ELISA に及ぼす影響。DENV1 - 4 型それぞれの NS1 抗原 (D1-NS1、D2-NS1、D3-NS1、D4-NS1) により複数回免疫したマウス 3~4 匹より採取した血清についてブロッキング ELISA で阻害率を測定し、JEV 抗原で免疫したマウス血清で得られた値と比較した。None は、非免疫マウス血清で得られた阻害率である。

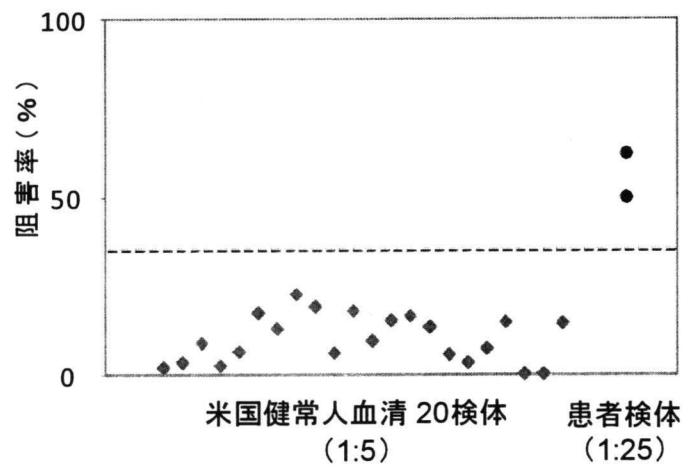


図 4. 米国健康人血清 20 検体を用いて求められたブロッキング ELISA による阻害率。破線は、平均+3SD により算出された 30.8%のカットオフ値を示す。参照として日本脳炎患者血清 2 検体の阻害率も示す。ただし、患者血清は 1:25 希釈で測定した (米国健康人血清は 1:5 希釈)。

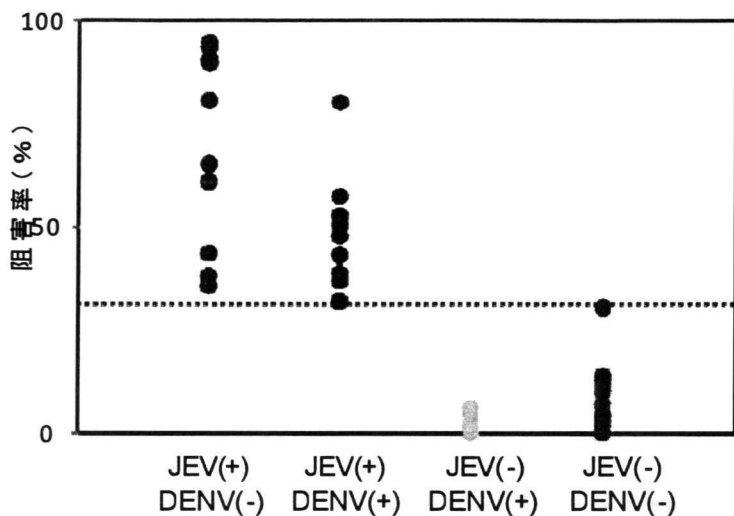


図5. JEV-NS1抗体あるいはDENV-NS1抗体が陽性 (+) あるいは陰性 (-) の4つのグループにおけるブロッキングELISAによる阻害率。破線は、カットオフ値 (30.8%) を示す。JEV(+)DENV(-)のグループには、JEV-NS1抗体強陽性である日本人血清10検体、JEV(+)DENV(+)にはフィリピン人血清11検体、JEV(-)DENV(+)にはフィリピン人血清16検体、またJEV(-)DENV(-)には日本人血清20検体を用いた。

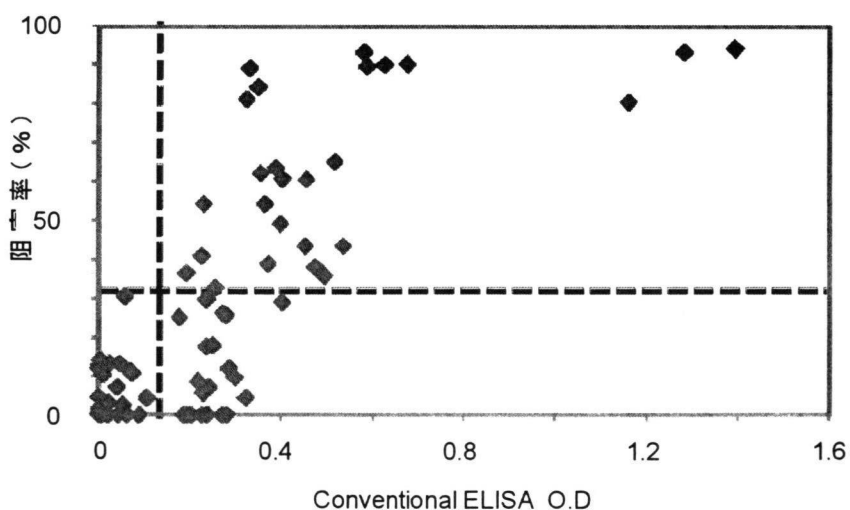


図6. コンベンショナルELISAで求められたNS1抗体値とブロッキングELISAで求められた阻害率との関係。破線は、コンベンショナルELISAにおけるカットオフ値 (0.185) 及びブロッキングELISAにおけるカットオフ値 (30.8%) を示す。

ウイルス感染症の診断、疫学および予防に関する研究：
フラビウイルス感染の治療法

分担研究者 竹上 勉 金沢医科大学総合医学研究所分子腫瘍学研究部門 教授

研究要旨：近年では本邦の日本脳炎患者数は年間 10 名に満たない数で推移しているが、国内において日本脳炎ウイルス(JEV)がいなくなったわけではない。分布ウイルス自身の遺伝子タイプの変遷や変異を考えると、JEV の病原性についての解析は継続して行っていくべきものであろう。我々は毎年石川県におけるウイルス媒介野外蚊からの日本脳炎ウイルス(JEV)の分離を定点(3 地点)、定時期(8 月末)に行い、さらにウイルス病原性についての解析を行っている。過去数年の採集蚊の推移をみると、1,458 匹(2006 年)、885 匹(2007 年)、990 匹(2008 年)と続き、2009 年は 1336 匹であったことから、蚊の生息数に大きな変化は無いことを示唆している。それらの破碎液を用いて RT-PCR 法及び培養 Vero 細胞によるウイルス分離を行った。RT-PCR 陽性サンプルは例年並みに 5 件あったが、ウイルス分離には至らなかった。遺伝子タイプの違いと病原性の差異を調べるために 2005 年分離の Ishikawa-K05 株(遺伝子タイプ 1 型)に注目した。Ishikawa-K05 株と JaGAR01 株(遺伝子タイプ 3 型)との比較では細胞における増殖性は JaGAR01 株が高いが、マウスに対する病原性では Ishikawa-K05 株の方が毒性は若干高かった。FACS による詳細な解析では両株共に細胞のアポトーシスを起こしていることが確認された。JEV 感染における宿主応答を遺伝子レベルから解析することも必要と思われ、我々は引き続き宿主応答の解析を行っている。感染病態の詳細な解析は将来的に有効治療に向けての有用な基礎データとなる。

A. 研究目的

近年では本邦における日本脳炎患者数は年間 10 名に満たない数で推移している。しかしながら、日本脳炎感染者は年間数万人になるとされる国外における流行拡大をみるまでもなく、日本国内での日脳感染動向も注意されるべきである。実際、石川県において 2007 年に 2 名の脳炎患者がでていた。こうした状況の中で、我々は 1998 年以来、石川県における定点、定時期で採取した野外蚊から JEV の分離を試みている。こうした日本北陸地域における JEV のウイルス分布状況の把握、さらにはウイルス病原性発揮機構の解明は脳炎大流行を抑えるためにも重要な課題と考え、研究目的としている。

B. 研究方法

蚊の採集: 蚊採集のために蚊帳及びドライアイスによる CO₂ 採集法を用いた。蚊帳を張る場所は豚舎に近い稲田(3 地点)で行っている。採集蚊 40 匹を 1 プールとして乳鉢にて PBS を入れ、破碎し、その破碎液は遠心法(10,000 x g、10 分間)にて分画した。

RNA 抽出及び RT-PCR: 蚊分画液を材料として Isogen 試薬を用いて RNA 抽出し、得られた RNA を用いて RT-PCR を行った。RT-PCR では JEV 特異的プライマーのエンベロープ(E)蛋白、NS4a 蛋白領域、さらに 3' 末端領域のプライマーを用いた。

ウイルス分離法: ウイルス分離のために培養細胞株 Vero 細胞を用いた。24 穴プレートを用い、5% 牛胎児血清入りの MEM 培養液の中で Vero 細胞を継代し、そこに蚊抽出液を吸着させた。4-5 日間の培養の後、細胞変

性の有無でウイルス存在を確認した。培養上清液については、さらにBHK細胞を用いてウイルスカ価を計測した。

遺伝子解析法: ウイルスゲノムに対応した複数のプライマーを用意し、PCR産物をテンプレートにして直接的塩基配列解析法によりヌクレオチド配列を決定した。

遺伝子発現・細胞解析: 感染細胞から抽出されたRNAを増幅・標識し、DNAマイクロアレイシステム(Affymetrix)を用いて宿主遺伝子の発現量を調べた。細胞解析にはフローサイトメリー活用(FACS)を行った。

マウス実験: ウイルスの病原性を調べるためにマウスICRにウイルスを接種(ip)、生死を観察した。

(倫理面からの配慮について)

組換えDNA実験については金沢医大組換えDNA安全委員会への申請許可の下に行い、マウス実験における注意事項は金沢医大動物委員会申請許可等を受けて行っている。

C. 研究結果

毎年、1,000匹台の野外蚊(1,759匹(2005年)、1,458匹(2006年)、885匹(2007年)、990匹(2008年))を採取しているが、2009年にも野外蚊1336匹を採取した。RT-PCR法およびヌクレオチド解析によって5件の陽性サンプルを得ているが、Vero細胞利用のウイルス分離には至らなかった。過去5年間における分離ウイルスは2005年サンプルからの石川株-05(Ishikawa-K05)(遺伝子タイプ1型)のみであった。Ishikawa-K05株とJaGAR01株(遺伝子タイプ3型)との比較では、細胞における増殖性はJaGAR01株の方が明らかに高いが、マウスに対する毒性に差異は無く、j若干ながらIshikawa-K05株の方が強い傾向にあった。ウイルス感染細胞への作用についてはFACS解析およびDNAマイクロアレイによる遺伝子発現解析を行った。両ウイルス株による細胞のアポトーシス誘導は同等のレベルであった。またウイルス感染に伴うIFN関連遺伝子発現誘導についてもほぼ同等の作用が認められた。

C. 考察

採集野外蚊からのRNAサンプルではRT-PCR、

ヌクレオチド解析の陽性が5プールで認められたが、ウイルス分離には至らなかった。しかしながらJEVが北陸地域に分布していることは他のデータも含めてみると明らかと言える。2005年に我々の分離したウイルスIshikawa-K05株については引き続き生物活性等を調査しているが、比較として用いているJaGAR01株に比べ、病原性は必ずしも低くはない。実際、細胞のアポトーシス誘導については両株に差は見られなかった。ウイルス感染に伴う宿主細胞における全遺伝子発現の網羅的解析から、IFN経路遺伝子発現の差異がウイルス増殖性に大きく影響することを明らかにしているが、これらの作用はマウスに対する毒性において両株での差異が見られないことと関わるものと推定される。

ここに示した結果は、現在の日本国内において多く分布しているウイルス(遺伝子タイプ1型)の毒性が低下していることを必ずしも意味しない。2007年には日本脳炎患者が石川県において発生している。近い将来起こる可能性のある日本脳炎の感染、流行を防ぐためにはウイルスの遺伝子解析と共に、ウイルス複製制御、病原性の要因解析を行っていく必要があり、引き続き北陸地域分布ウイルスの分離、遺伝子レベルからの解析を継続していくことが重要といえる。またワクチン接種率の低下による抗体陽性者数の減少がある現在、他方で新たな治療法の開発も重要である。ウイルス病原性解析はその目標につながるものとする。

E. 結論

2009年採集野外蚊1336匹からのRT-PCRでは5件のJEV陽性例があったがウイルス分離は成功しなかった。マウス実験では2005年分離のJEV株(Ishikawa-K05、遺伝子タイプ1型)の病原性は必ずしも低いものではなく、近年の国内分布ウイルスの病原性変動に注目すべきと考える。FACSおよびDNAマイクロアレイによる解析で、JEV感染細胞では両株共にアポトーシス誘導、IFN経路遺伝子発現誘導が顕著で、こうした宿主応答がウイルス病原性に大きく影響することが再認識された。

F. 健康危険情報

北陸においても、病原性のある日本脳炎ウイルスを野外蚊が保有し、病原ウイルスが近辺に存在しているという事実に注意が必要であろう。(関連事項: 月刊誌『アクタス』(北国新聞)(2009年6月号)に日本脳炎ウイルス注意に関する記事掲載)

G. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Nukuzuma S, Kameoka M, Sugiura S, Nakamichi K, Nukuzuma C, Miyoshi I, Takegami T: Archetype JC virus efficiently propagates in kidney-derived cells stable expressing HIV-1 Tat. *Microbiol Immunol* 53: 621-628, 2009
- (2) Nukuzuma S, Nakamichi K, Nukuzuma C, Takegami T: Inhibitory effect of serotonin antagonists on JC virus propagation in a carrier culture of human neuroblastoma cells. *Microbiol Immunol* 53: 496-501, 2009

2. 学会発表

- 1) 村上 学、上村 清、及川陽三郎、太田隆英、石垣靖人、竹上 勉: 石川県での分離 JEV(Ishikawa-K05)の細胞と実験動物での毒性 第 44 回 日本脳炎ウイルス生態学研究会、小樽 (2009. 6)

- 2) 太田隆英、前田雅代、村上 学、竹上 勉、達家雅明: ヒト上皮系細胞株において RhoGDI β は中心体および頂端側細胞間接着部位に存在する、第 68 回日本癌学会総会、横浜 (2009, 10)
- 3) 村上 学、及川陽三郎、上村 清、竹上 勉: 石川県内の水田近辺で行った CDC 型トラップによる蚊の採集結果、第 16 回トガ・フラビ・ペステウイルス研究会、東京 (2009, 10)
- 4) 竹上 勉、村上 学: フラビウイルス感染における宿主応答とウイルス病原性との関わり、第 57 回日本ウイルス学会、東京 (2009, 10)
- 5) 村上 学、竹上 勉: Ishikawa-K05 (2005 年石川県分離日本脳炎ウイルス)感染時の細胞毒性と細胞応答、第 57 回日本ウイルス学会、東京 (2009, 10)
- 6) 奴久妻聡一、亀岡正典、杉浦重樹、中道一生、奴久妻智代子、三好勇夫、竹上 勉: HIV-1 Tat による Archetype JC ウイルスの増殖促進、第 57 回日本ウイルス学会、東京 (2009, 10)
- 7) 蔡傑、石垣靖人、太田隆英、村上 学、竹上 勉: HCV 蛋白 NS3 は宿主遺伝子の安定性に影響する、第 32 回日本分子生物学会、横浜、(2009, 12)

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

アルボウイルスの病原性

デングウイルスの細胞トロピズムについての研究

分担研究者 森田 公一 長崎大学・熱帯医学研究所 教授

研究要旨：デングウイルスの急性感染によって発症するデング熱・デング出血熱（DF/DHF）は熱帯地域全域で猛威をふるっている。我が国でも輸入例における死亡例も報告されている。しかしながら重症のデング出血熱の発症機序については不明のままである。これまで2次感染における抗体依存性の感染増強現象（antibody dependent enhancement; ADE）や遺伝的素因、細胞免疫の高度な刺激、ウイルスの差異などさまざまな要因が提唱されているが、効果的な治療薬、治療法確立のため、発症機序の分子レベルでの理解が必要である。デングウイルスはさまざまなヒト由来の細胞に感受性があることが知られてきた。特に、蚊の吸血により侵入したウイルスが末梢血細胞で感染・増殖することは、病原性やウイルスの伝播に重要であると考えられている。しかし、デングウイルスの血球細胞に対する細胞向性については不明な点が多い。昨年の本研究により我々はベトナムで出血熱患者から分離したデングウイルス株に高い感受性を持つ K562_{clone3} 細胞の確立に成功した。本年の研究では K562_{clone3} 細胞に対する DENV の結合能を定量的に測定しこの K562_{clone3} 細胞のデングウイルスに対する感染性の増加が細胞膜上の感染受容体に由来すると結論した。

A. 研究目的

デングウイルス感染でみられる重症型のデング出血熱の発症メカニズムを解明するため、ウイルスと感染細胞の特性を分子レベルで明らかにすることを目的としている。

2) フローサイトメトリー解析

各種ヒト血球系細胞を種々の細胞膜成分に対する標識抗体で処理しベクトン社製の FACSCalibur と CellQuest software により解析した。

B. 研究方法

1) ウイルス結合性の定量化

デングウイルスと培養細胞とを 4℃で反応させたのちデングウイルスに対するモノクローナル抗体を蛍光標識したプローブで可視化してフローサイトメトリー解析に供した。

3) 網羅的な発現蛋白質の解析

各種細胞から抽出した膜成分蛋白質を日立社製の nLC/MS により質量分析を実施してプロテオーム解析をする一方で、細胞質分画から mRNA を抽出しマイクロアレイを用いて発現遺伝子の多寡を測定した。

C. 結果

1) K562_{c1one3} 細胞の発現タンパク質と細胞表面抗原による特徴づけ

Fig. 1 に示すように、K562_{c1one3} 細胞はデングウイルスにたいして高い結合性をしめす。K562 細胞が様々な細胞（単球、赤血球、顆粒球）に分化する性質を持っているため、K562_{c1one3} 細胞がどのような状態に分化しているかを解析した。まず、K562 細胞の初期細胞株である K562_{RCB0027} 細胞と我々が樹立した K562_{c1one3} 間での、細胞表面抗原や細胞内成分の変化を解析した。その結果 K562_{c1one3} は、ヘモグロビンを多く発現しており、また赤芽球特異的膜タンパク質である glycoporphin-A (gpA) を、細胞表面に発現していることが明らかとなった (Fig. 2)。これらの結果から、K562_{c1one3} は赤芽球系細胞に分化した状態であることが示された。赤芽球は、これまで報告されていない、新たな DENV の細胞標的である可能性がある。

2) マイクロアレイ法による K562_{RCB0027} 細胞と K562_{c1one3} 間の細胞膜タンパク質の発現比較解析

DNA アレイを用いた 2 種類の K562 細胞間の比較ゲノミクス解析を用い、細胞膜画分の発現比較解析を行い、DEN2 ウイルス結合性の強い K562_{c1one3} 特異的に発現している細胞膜タンパク質のリストを作成した。その結果、21 種類の細胞膜タンパク質が K562_{c1one3} に強く発現しており、受容体の候補として考えられた。

3) siRNA を用いた受容体候補のノックダウン解析

マイクロアレイの結果で得られた受容体候補を siRNA を用い、それぞれノックダウ

ンを行い、DEN2 ウイルスの結合性に影響を与えるか解析を行った。その結果、Syndecan-2 (SDC2) のみ結合性の減少が見られ、その他の候補では結合性に変化が見られなかった。Syndecan-2 のノックダウンにより、結合性は 60-70 %減少した (Fig. 3)。

4) SDC2 の DEN2 ウイルスに対する結合能の詳細な解析

SDC2 はヘパラン硫酸結合性プロテオグリカン (Heparansulfateproteoglycan ; HSPG) に分類される、グリコサミノグリカンを持つ、タンパク質の一つである。そこで、SDC2 の DEN2 ウイルスに対する結合性がタンパク質間の結合を介したのかタンパク質-グリコサミノグリカンの結合を介するかを検討した。K562_{c1one3} 細胞をヘパラン硫酸分解酵素処理を行いその結合性の変化を見たところ、結合性に有意な差は見られなかった (Fig. 4)。これは、グリコサミノグリカンが DEN2 ウイルスの SDC2 への結合性に大きく関与していない可能性を示唆していた。

D. 結論

1) K562_{c1one3} 細胞は、赤芽球系の細胞に分化した細胞である。

2) SDC2 が K562_{c1one3} 細胞上の DEN2 ウイルスに対する結合性獲得に重要であることを示した。

3) SDC2 の DEN2 ウイルスに対する結合はグリコサミノグリカンが大きく関与していないことを示唆した。

E. 考察

デングウイルスは種々のヒト単核細胞に感染することが知られている。そのさいウイルスは細胞上の異なる分子をリセプターとして使

う可能性がある。今回明らかにしようとしているデングウイルスリセプター分子を同定することで出血熱患者から分離した本実験で使用している DEN2 ウイルス株の赤芽球に対する結合性獲得の意義や SDC2 の詳細な相互作用様式について理解がすすみ、デング病原性発現を解明する一助となると期待される。

F. 研究発表

1) 論文発表

Inoue S., Alonzo M., Kurosawa Y., Reyes J. Dimaano E., Alera M., Saito M., Oishi K., Hasebe F., Matias R., Natividad F. and Morita K. Evaluation of a dengue IgG-indirect ELISA and a Japanese encephalitis IgG-indirect ELISA for diagnosis of secondary dengue virus infection. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases* 2009

Kinoshita H, Mathenge EG, Hung NT, Huong VT, Kumatori A, Yu F, Parquet MC, Inoue S, Matias RR, Natividad FF, Morita K, Hasebe F. Isolation and characterization of two phenotypically distinct dengue type-2 virus isolates from the same dengue hemorrhagic Fever patient. *Jpn J Infect Dis.* Vol. 62(5):343-50. 2009

Le Roux CA, Kubo T, Grobbelaar AA, van Vuren PJ, Weyer J, Nel LH, Swanepoel R, Morita K, Paweska JT. Development and evaluation of a real-time reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification assay for rapid detection of Rift Valley fever virus in clinical specimens. *J Clin Microbiol.* Vol. 47(3): 645-51. 2009

Evidence of frequent introductions of Japanese encephalitis virus from south-east Asia and continental east Asia to Japan. Takeshi Nabeshima, Hyunh Thi Kim Loan, Shingo Inoue, Makoto Sumiyoshi, Yasuhiro Haruta, Phan Thi Nga, Vu Thi Que Huong, Maria del Carmen Parquet, Futoshi Hasebe, and Kouichi Morita. *J Gen Virol.* Vol.90: 827-832. 2009

Kouichi Morita. Molecular epidemiology of Japanese encephalitis in East Asia. *Vaccine.* Vol.27:7131-7132, 2009

森田公一;蚊媒介性の熱帯性ウイルス疾患—デング出血熱の発症機序をめぐって—;最新医学 (The Medical Frontline) , Vol 64(4), 919-923, 2009.

森田公一、木下一美;デング熱研究の最前線;医学のあゆみ (J. Clin. Exp. Med.) Vol. 229(4), 241-245, 2009

森田公一;日本脳炎ワクチン、化学療法の領域、Vol.25:1459-1465. 2009

森田公一;「日本脳炎、その他の脳炎」、in 新臨床内科学第九版、高久史磨・尾形悦郎・黒川清・矢崎義雄 監修、医学書院、2009

2) 学会発表

国際会議における発表

Takeshi Nabeshima, Hyunh Thi Kim Loan, Shingo Inoue, Makoto Sumiyoshi, Yasuhiro Haruta, Phan Thi Nga, Vu Thi Que Huong, Maria del Carmen Parquet, Futoshi Hasebe, Kouichi Morita : Frequent introductions of Japanese encephalitis virus from Southeast Asia and continental East Asia to Japan. *International Joint Forum on Infectious*

Diseases 2009. Siam City Hotel, Bangkok, Thailand, 2009年9月16-17日。(Oral Presentation II)

Futoshi Hasebe, Nguyen Thi Thu Thuy, Nguyen Co Thach, Vuong Duc Cuong, Ngo Khanh Phuong, Shingo Inoue, Yu Fuxun, Pham Cong Tien, Dang Tuan Dat, Phan Thi Nga, Le Thi Quynh Mai, Kouichi Morita : 2009 Bats Survey in Vietnam – Bats are important reservoir hosts of arboviruses . . International Joint Forum on Infectious Diseases 2009. Siam City Hotel, Bangkok, Thailand, 2009年9月16-17日。(Poster Session)

Futoshi Hasebe, Takeshi Nabeshima, Hyunh Thi Kim Loan, Shingo Inoue, Makoto Sumiyoshi, Yasuhiro Haruta, Phan Thi Nga, Vu Thi Que Huong, Maria del Carmen Parquet, Kouichi Morita: Frequent introductions of Japanese encephalitis virus from south-east Asia and continental east Asia: FIRST GMS FORUM ON JAPANESE ENCEPHALITIS PREVENTION AND CONTROL: ACHIEVEMENTS AND ORIENTATION, Hue City, Vietnam, 20-30 October, 2009.

Kouichi Morita, Kenta Okamoto, Tomoshirou Endo, Shingo Inoue, Takeshi Nabeshima, Posadas H. Guillermo, Fuxun Yu, Nguyen Thanh Thuy, Bui Minh Trang, Nguyen Tran Hien, Vu Sinh Nam, Filipinas F. Natividad, Phan Thi Nga, Futoshi Hasebe: Development of a new method for detection and identification of new encephalitis viruses and unknown viruses: FIRST GMS FORUM ON JAPANESE ENCEPHALITIS PREVENTION AND

CONTROL: ACHIEVEMENTS AND ORIENTATION, Hue City, Vietnam, 20-30 October, 2009.

Phan Thi Nga, Do Phuong Loan, Nguyen Viet Hoang, Bui Minh Trang, Le Thi Hien Thu, Futoshi Hasebe, Shingo Inoue, Kouichi Morita, Arnaud Fontanet, Paul Brey, Nguyen Tran Hien: Development of a new method for detection and identification of new encephalitis viruses and unknown viruses: FIRST GMS FORUM ON JAPANESE ENCEPHALITIS PREVENTION AND CONTROL: ACHIEVEMENTS AND ORIENTATION, Hue City, Vietnam, 20-30 October, 2009.

Kouichi Morita, Takeshi Nabeshima, Hyunh Thi Kim Loan, Shingo Inoue, Makoto Sumiyoshi, Yasuhiro Haruta, Vu Thi Que Huong, Maria del Carmen Parquet, Futoshi Hasebe, Phan Thi Nga: Frequent introductions of Japanese encephalitis virus from Southeast Asia and continental East Asia: The 4th Nagasaki Symposium on Tropical and Emerging Infectious Diseases, Nagasaki City, Japan, 26-28 December, 2009.

Kazuya I.P.J. HIDARI, Kouichi MORITA, Takashi SUZUKI : ANTI-DENGUE VIRUS ACTIVITY OF SULFATED POLYSACCHARIDES. Emerging Infectious Diseases 2009. Duke-NUS Graduate Medical School & Ministry of Health, Singapore, 2009年12月8-11日。

Yasunami M, Nguyen TPL, Horie H, Kurata S, Yamazaki A, Shibata H, Vu TQH, Tran

TT, Ha MT, Vo VT, Tran VD, Kikuchi M, Morita K, Hirayama K : SUSCEPTIBILITY TO SEVERE DENGUE VIRUS INFECTION CONFERRED BY LYMPHOCYTE ACTIVATION GENE 3 (LAG3) POLYMORPHISM. Duke-NUS Graduate Medical School & Ministry of Health, Singapore, 2009年12月8-11日 .

M. A. Islam, Choudhury, M.A.H.Z., Banu, S., Solaiman, H., Moula, K., and Morita, K. : ISOLATION AND IDENTIFICATION OF THREE SERO-TYPES OF DENGUE VIRUSES FROM THE OUTBREAK YEAR 2007 AND 2008 IN BANGLADESH. Duke-NUS Graduate Medical School & Ministry of Health, Singapore, 2009年12月8-11日 .

Pandey B, Pun R, Pant K, Shah OP, Shah Y, Poudel A, Morita K, Inoue S, Kurane I : SEROLOGICAL AND MOLECULAR STUDY OF DENGUE VIRUS INFCION IN THE ENDEMIC TERAJ REGION OF NEPAL. Duke-NUS Graduate Medical School & Ministry of Health, Singapore, 2009年12月8-11日 .

国内会議における発表

左一八、在原雅貴、加藤大介、渡邊一平、森田公一、鈴木隆：日本脳炎ウイルス感染における硫酸化糖鎖分子の構造と機能。第44回日本脳炎ウイルス生態学研究会・北海道千歳市、2009年6月19日・20日

早坂大輔：ダニ媒介性脳炎ウイルスをマウスに異なる経路で摂取した際の発症・致死性の比較。第44回日本脳炎ウイルス生態学研究会・北海

道千歳市、2009年6月19日・20日

吉川亮、井上真吾、吾郷昌信、森田公一：長崎県におけるイノシシの日本脳炎抗体保有率調査（第2報）。第44回日本脳炎ウイルス生態学研究会・北海道千歳市、2009年6月19日・20日

岡本健太、遠藤友志朗、Possadas Guillermo、余福勲、Maria del Carmen Parquet、鍋島武、井上真吾、Nguyen Thanh Thuy、Bui Minh Trang、Nguyen Tran Hien、Vu Sinh Nam、Filipinas F. Natividad、長谷部太、森田公一：プロテオミクス法を用いた蚊媒介性ウイルスの迅速的網羅的同定法の開発。第44回日本脳炎ウイルス生態学研究会・北海道千歳市、2009年6月19日・20日

左一八、渡邊一平、在原雅貴、加藤大介、杉浦信夫、木全弘治、長岡正人、森田公一、鈴木隆：フラビウイルス感染に関わる硫酸化糖鎖分子の構造と機能。第29回日本糖質学会年会・岐阜県高山市、2009年9月9日・11日

渡邊一平、左一八、在原雅貴、加藤大介、杉浦信夫、木全弘治、森田公一、鈴木隆：グリコサミノグリカンによるフラビウイルス感染阻害。第29回日本糖質学会年会・岐阜県高山市、2009年9月9日・11日

長谷部太： Dengue ウイルスと viral quasispecies(ウイルス準種)。第50回日本熱帯医学会大会・沖縄県宜野湾市沖縄コンベンションセンター、2009年10月22-23日。

岡本健太、遠藤友志朗、井上真吾、鍋島武、Posadas Guillermo、余福勲、Filipinas F. Natividad、Phan Thi Nga、長谷部太、森田公一：LC/MS/MSを用いた蚊媒介性ウイルスの迅速的網羅的同定法。第50回日本熱帯医学

会大会・沖縄県宜野湾市沖縄コンベンションセンター、2009年10月22-23日。

Lyre Anni Murao, Kouichi Morita: RNA-dependent regulation of the interferon response by dengue virus. 第50回日本熱帯医学会大会・沖縄県宜野湾市沖縄コンベンションセンター、2009年10月22-23日。

Tran Thi Ngoc Ha, Nguyen Tien Huy, Lyre Murao, Vu Thi Que Huong, Tran Thi Thuy, Mihoko Kikuchi, Michio Yasunami, Kouichi Morita, Kenji Hirayama: Role of circulating plasma DNA in severe dengue disease. 第50回日本熱帯医学会大会・沖縄県宜野湾市沖縄コンベンションセンター、2009年10月22-23日。

渡辺直熙、Nguyen Thi Phuong Lan、Vu Thi Que Huong、Tran Thi Thuy、Vo Dinh Tham、Tran Van Dat、菊池三穂子、安波道郎、森田公一、平山謙二、古田隆久：デング熱の病態形成におけるマスト細胞の関与。第50回日本熱帯医学会大会・沖縄県宜野湾市沖縄コンベンションセンター、2009年10月22-23日。

上地玄一郎、山城哲：フェージディスプレイ法を用いたインフルエンザウイルス H5N1 亜型に中和活性を示すヒト単クローン性抗体の分離。第50回日本熱帯医学会大会・沖縄県宜野湾市沖縄コンベンションセンター、2009年10月22-23日。

山城哲、中込とよ子、中込治：北部ベトナムにおける小児重症下痢症に関する網羅的病因探索と混合感染の重要性に関する研究。第50回日本熱帯医学会大会・沖縄県宜野湾市沖縄コンベンションセンター、2009年10月22-23日。

吾郷昌信、平野学、山口顕徳、吉川亮、Umami

Qifqiyar Nur, 西村順裕、清水博之：上気道炎患者由来検体からの高感度エンテロウイルス検出同定法。第57回日本ウイルス学会学術集会・東京都千代田区都市センター、2009年10月25-27日

山城哲、中込とよ子、中込治：ベトナムにおける重症小児科下痢症に関する疫学研究。第57回日本ウイルス学会学術集会・東京都千代田区都市センター、2009年10月25-27日

堀田こずえ、高桑弘樹、村瀬敏之、小野悦郎、伊藤壽啓、大槻公一、山城哲：ハノイ市郊外で飼育されるアヒルおよびブタにおける A 型インフルエンザウイルス分布調査。第57回日本ウイルス学会学術集会・東京都千代田区都市センター、2009年10月25-27日

余福薫、木下一美、井上真吾、長谷部太、森田公一：Sero-diagnosis of SARS infection using recombinant N protein expressed by baculovirus expression system. 第57回日本ウイルス学会学術集会・東京都千代田区都市センター、2009年10月25-27日

左一八、加藤大介、森田公一、鈴木隆：硫酸化糖鎖を介したデングウイルス-宿主細胞間相互作用。第57回日本ウイルス学会学術集会・東京都千代田区都市センター、2009年10月25-27日

北浦一孝、藤井克樹、早坂大輔、高島郁夫、高崎智彦、鈴木隆二、倉根一郎：ダニ媒介性脳炎ウイルス感染マウスにおける脳炎発症に関わる脳内浸透潤 T 細胞の解析。第57回日本ウイルス学会学術集会・東京都千代田区都市センター、2009年10月25-27日

早坂大輔、永田典代、長谷川秀樹、佐多徹太郎、高島郁夫、小池智：ダニ媒介性脳炎ウイルス

(TBEV) を脳内接種した際にみられる早い時期の致死性. 第 57 回日本ウイルス学会学術集会・東京都千代田区都市センター、2009 年 10 月 25-27 日

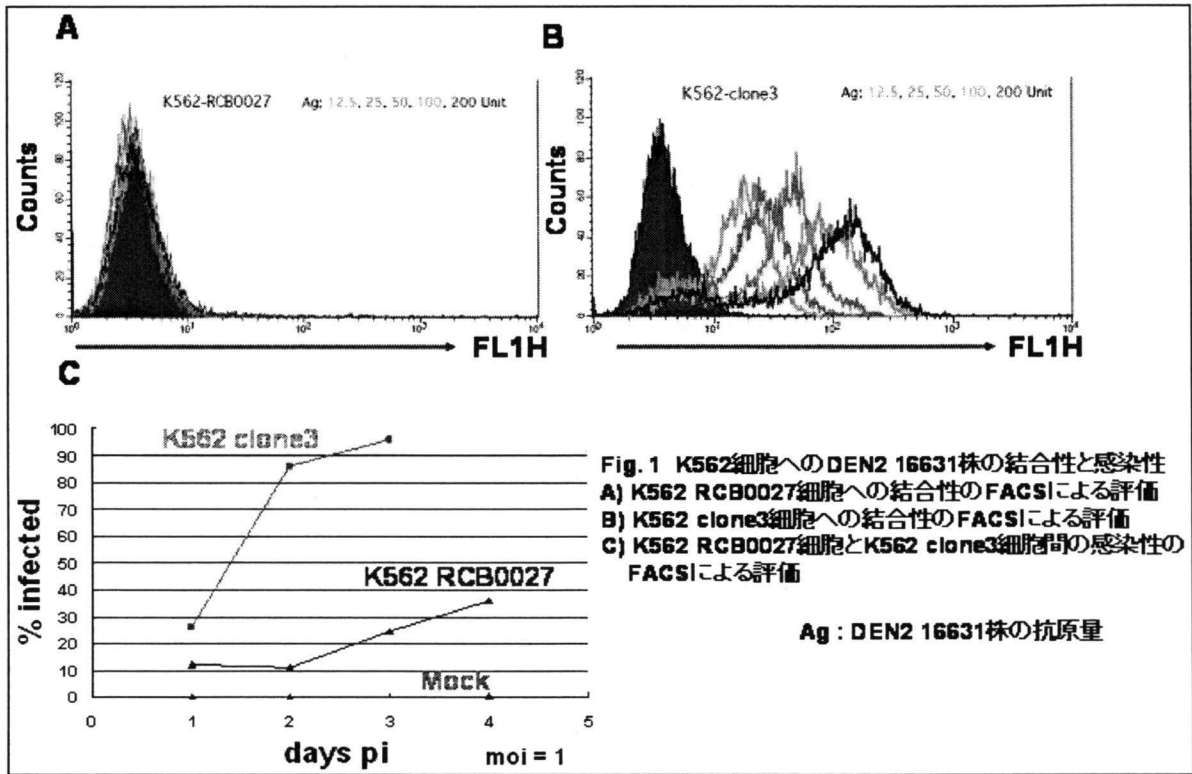
吉川亮、井上真吾、吾郷昌信、森田公一：長崎県におけるイノシシの日本脳炎ウイルス感染状況. 第 57 回日本ウイルス学会学術集会・東京都千代田区都市センター、2009 年 10 月 25-27 日

久保亨、井上真吾、森田公一：ケニア共和国における黄熱ウイルスならびにその他の蚊媒介性熱帯ウイルス感染症の網羅的血清学的解釈. 第 57 回日本ウイルス学会学術集会・東京都千代田区都市センター、2009 年 10 月 25-27 日

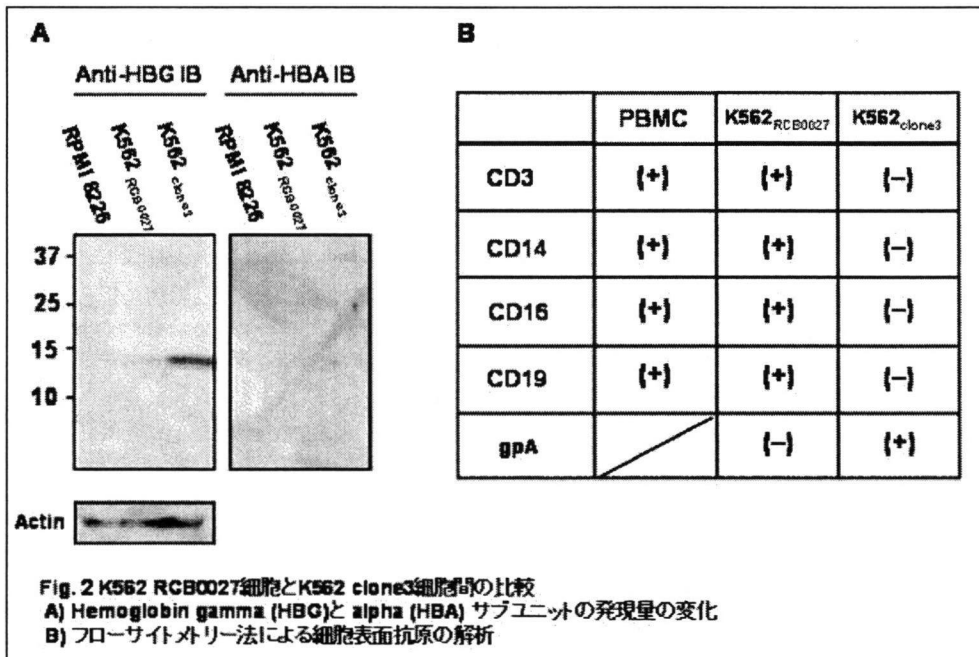
H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

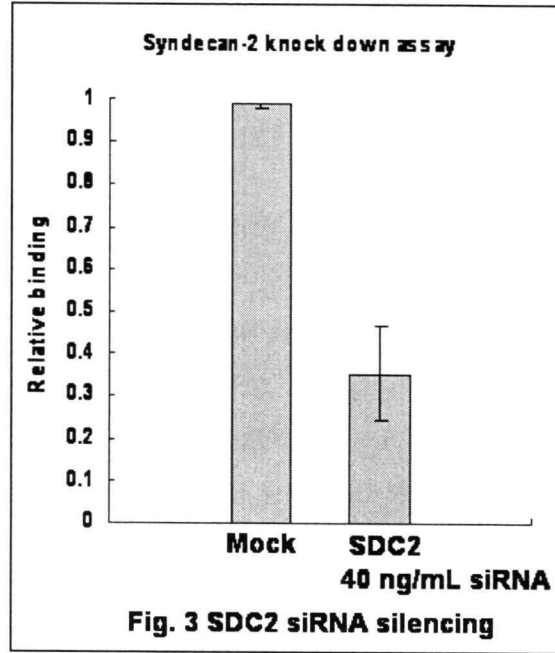
(Fig. 1)



(Fig. 2)



(Fig. 3)



(Fig. 4)

