

平成 22 年度厚生労働科学研究費補助金
(医薬品医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業)
分担研究報告書

「新規フラビウイルス検出法開発のための基盤的研究」

分担研究者 田島茂 (国立感染症研究所・ウイルス第一部・主任研究官)
協力研究者 加藤文博 (国立感染症研究所・ウイルス第一部第二室・研究生)

迅速、高感度かつ簡便に感染性ウイルスを検出できる新規フラビウイルス検出方法の開発を目指し、昨年度までにデングウイルスレポーターミニゲノムクローンの作製に成功した。本クローンのマイナス鎖 RNA を導入した細胞よりルシフェラーゼ活性が検出できたことから、レポーターミニゲノムのマイナス鎖が合成されればルシフェラーゼ活性により検出可能であることが示唆された。次にレポーターミニゲノムのプラス鎖 RNA とデング 1 型ウイルスレポーターレプリコン RNA を共導入しルシフェラーゼ解析を行なったが、活性は検出されなかった。デングウイルスレプリコンの複製能を調べたところ、非常に低いあるいはほとんど複製していないことが示唆された。よってミニゲノムのレポーター活性が検出されなかった原因は、ミニゲノムの構造上の欠陥よりも複製に関わる蛋白質の供給がうまくいっていないためと考えられる。しかしミニゲノムの構造に問題が無いとは断言できず、更なる検証が必要である。

A. 研究目的

米国において輸血や臓器移植によるウエストナイルウイルス感染例が報告されていることから、移植組織におけるフラビウイルス検査は非常に重要である。患者血清中のフラビウイルスの検出法としては、1) ウイルス感受性細胞への接種、2) ELISA 等によるウイルス抗原の検出、3) PCR 法によるウイルス遺伝子の増幅などが挙げられるが、検出感度および迅速性から PCR 法 (NAT 法) が最も一般的である。しかし、擬陽性や操作時のコン

タミネーションの危険性なども指摘されている。さらには核酸検出法ではウイルスの感染性 (能) を判断することはできない。本研究では、感染力を持つフラビウイルスを簡便、迅速かつ高感度に検出するための基盤技術の開発を目的とし、一昨年および昨年に引き続きレポーターミニゲノムを用いた感染性ウイルス検出系の構築を試みた。

基礎医学研究や抗ウイルス剤探索に感染性ウイルスを使用する場合、実験従事者には感染リスクが発生する

ばかりでなく、感染性ウイルスが拡散する危険性も発生する。危険性を阻止するために、病原体の病原性・伝搬性に応じて拡散防止措置が義務付けられているが、その代償として操作性が不便になる。このような状況を打開する手段として、フラビウイルスにおいてはレプリコンを使用するが非常に都合が良い。レプリコンとは自立的に複製可能なウイルスゲノム単位であるが、一般的には「感染性は無いが細胞内で複製は可能」なゲノム領域を指す。フラビウイルスではゲノム上の構造蛋白質領域の大部分を欠損させ、その代わりにレプリコンの複製を簡便にモニターするためのレポーター遺伝子（ルシフェラーゼ遺伝子や発光蛋白質遺伝子）を挿入したものが作製されている。これまでに我々は、デングウイルスの構造蛋白質コード領域の大部分を *Renilla* ルシフェラーゼ遺伝子に置換したデングウイルスレポーターレプリコンを作製した。これを用いて前述のレポーターミニゲノムの解析を昨年度行なったが、ミニゲノムの複製が確認できなかった。この原因を探るためにレポーターレプリコンの複製能を調べたが、複製に伴うレポーター活性が得られなかった。以上よりミニゲノムの複製が確認されない原因は、レポーターレプリコンの複製が起こらず、ミニゲノム複製のためのウイルス側複製関連蛋白質の供給がなされていないためと推測された。そこでデングレポーターレプリコンが正常に機能しない原因を探るため、本

年度新たに日本脳炎ウイルスレポーターレプリコンクローンを構築し、その複製能を複製阻害剤を使用して解析した。

B. 実験方法

日本脳炎ウイルスレポーターレプリコンの構築はデングウイルスレプリコンと同様に行なった（図1）。日本脳炎ウイルス感染性分子クローン rJEV(Mie41)/pMW119 の C 蛋白質 N 末端側 23 アミノ酸から E 蛋白質 C 末側 28 アミノ酸までをルシフェラーゼ遺伝子-IRES 配列に置換することにより作製した。日本脳炎ウイルスレプリコンプラスミドよりレプリコン RNA を *in vitro* で合成後、Vero 細胞および BHK21 細胞に導入した。経時的に細胞を回収し抽出液を得、ルシフェラーゼ解析に供した。得られたレポーター活性が確かにウイルス複製に付随することを確認するため、フラビウイルスの複製を阻害することが知られているリバビリンを添加し、レポーター活性が低下するかを調べた。レプリコンを導入した Vero 細胞にリバビリンの量を変えて添加し、12 および 66 時間後に細胞を回収しルシフェラーゼ活性を測定した。リバビリンの細胞毒性については MTT 法により評価した。さらに日本脳炎ウイルスの増殖がリバビリンにより抑制されることを確認するため、ウイルス増殖能試験を行なった。Vero 細胞にウイルスを接種後、リバビリンを添加し 24 時間後に培養上清を回収し、これに含まれる感染性

ウイルス数（力価）をプラーク法により測定した。

C. 研究結果

日本脳炎ウイルス感染性分子クローン rJEV(Mie41)/pMW119 の C 蛋白質 N 末端側 23 アミノ酸から E 蛋白質 C 末端側 28 アミノ酸までをルシフェラーゼ遺伝子-IRES 配列に置換することにより、日本脳炎ウイルスレポーターレプリコン rJEVRepRL4/pMW119 を作製した（図 1）。本レプリコンプラスミドよりレプリコン RNA を *in vitro* で合成後、Vero 細胞および BHK21 細胞に導入し、経時的に細胞を回収し抽出液を得、ルシフェラーゼ活性を調べた。Vero 細胞において、レプリコン複製に伴うルシフェラーゼ活性の顕著な増加（ピーク）が観察された（図 2）。一方 BHK21 細胞では明らかなピークは観察されなかった。これより以降の実験では Vero 細胞を使用した。複製によると思われるピークが確かにウイルス複製に付随していることを確認するため、フラビウイルスの複製を阻害する活性を有する薬剤リバビリンにより、レポーター活性が低下するかを調べた（図 3）。その結果リバビリンの用量依存的にレポーター活性の低下が確認できた。この活性低下がリバビリンの細胞毒性を調べるため、リバビリン添加細胞について MTT アッセイを行なった（図 3）。本アッセイにより細胞毒性は観察されず、リバビリン添加によるレポーター活性の低下は細胞毒性によるものではない

ことが確認された。レポーター活性の低下が観察されたリバビリン濃度で日本脳炎ウイルスの増殖が低下するかを調べたところ、確かにウイルス増殖の低下が確認された（図 4）。

D. 考察

昨年度までにデングウイルスミニゲノムプラスミドおよびデングウイルスレポーターレプリコンプラスミドの構築に成功した。しかし、これらから合成したミニゲノム RNA およびレポーターレプリコン RNA の複製は確認できなかった。複製に関わる蛋白質が供給できないとミニゲノムの複製は確認できない。よってミニゲノムの機能解析には、その供給元であるレポーターレプリコンがきちんと機能することが必須である。デングウイルスレポーターレプリコンが効率的に複製しない理由は不明である。この原因を探るために本年度は同じフラビウイルスに属する日本脳炎ウイルスのレポーターレプリコンクローン構築を試みた。これまでの経験上、日本脳炎ウイルス分子クローンの方が扱いが容易であり、こちらで構築に関する様々な検討を行ないその結果をデングウイルスレプリコンの構築に役立てることを意図してのことである。デングウイルスレプリコンと同様に構築したにもかかわらず、日本脳炎ウイルスレプリコンでは複製産物に由来すると思われるレポーター活性のピークが検出された。またリバビリンを使用した実験結果も、レポーター活性

が複製に付随することを示唆した。デングウイルスと日本脳炎ウイルスとで見られた差異が何に起因するかは今のところ不明である。今後は日本脳炎ウイルスレプリコンを用いてさらに高い活性を示すクローンの構築を試みる予定である。

E. 結論

日本脳炎ウイルスレポーターレプリコンクローンを構築した。本クローンから合成されたレプリコン RNA は複製能を維持していることが確認された。

F. 健康危険情報 特になし

F. 研究発表

論文発表 (英文)

- 1) Ito, M., Takasaki, T., Kotaki, A., Tajima, S., Yuwono, D., Rimal, H.S., dos Santos, F., de Jesus, M.D., Lina B.B., Tsuda, Y., Lim, C.K., Nerome, R., Caleres, A., Shindo, N., Drager, R.D., Andjaparidze, A., and Kurane, I. Molecular and virological analyses of dengue virus responsible for dengue outbreak in East Timor in 2005. *Jpn. J. Infect. Dis.*, 63: 181-184, 2010.
- 2) Moi, M.L., Takasaki, T., Kotaki, A., Tajima, S., Lim, C.K., Sakamoto, M., Iwagoe, H., Kobayashi, K., and Kurane I. Importation of dengue virus type 3 to Japan from Tanzania and

Cote d'Ivoire. *Emerging Infectious Diseases* 16: 1770-1772, 2010.

- 3) Tajima, S., Takasaki, T., and Kurane, I. Restoration of replication-defective dengue type 1 virus bearing mutations in the N-terminal cytoplasmic portion of NS4A by the additional mutations in the NS4B. *Archives of Virology* 156: 63-69, 2011..

学会発表

- 1) 加藤文博、田島茂、山口幸恵、小滝徹、司馬肇、細野邦昭、高崎智彦、倉根一郎：3'NTR内に変異を有する日本脳炎ウイルス変異体の*in vitro*における増殖性および病原性解析 第45回日本脳炎ウイルス生態学研究会 東京 2010年5月
- 2) 山口幸恵、田島茂、小滝徹、澤辺京子、渡邊治雄、高崎智彦、倉根一郎：日本脳炎ウイルスE蛋白質の1アミノ酸置換 (S123N) がウイルス増殖に及ぼす影響 第45回日本脳炎ウイルス生態学研究会 東京 2010年5月
- 3) Tajima, S., Yamaguchi, Y., Kato, F., Takasaki, T., and Kurane, I. Effects of single amino acid substitutions at position 123 in the Japanese encephalitis virus E protein on its growth rate *in vitro* and pathogenicity in mice. 1st Asia Pacific Wo

rkshop on Neurovirology. Seoul, South Korea. July 15-17, 2010.

- 4) 田島茂、高崎智彦、倉根一郎：in vitroにおけるデング1型ウイルスおよび日本脳炎ウイルスの増殖性および感染細胞側応答の比較 第58回日本ウイルス学会学術集会 徳島 2010年11月
 - 5) 加藤文博、田島茂、司馬肇、細野邦昭、高崎智彦、倉根一郎：フラビウイルスレポーターレプリコンの構築 第58回日本ウイルス学会学術集会 徳島 2010年11月
 - 6) 山口幸恵、田島茂、小滝徹、澤辺京子、渡邊治雄、高崎智彦、倉根一郎：ウイルス性状における日本脳炎ウイルスE蛋白質の1アミノ酸置換の影響 第58回日本ウイルス学会学術集会 徳島 2010年11月
 - 7) 小滝徹、林昌宏、田島茂、高崎智彦、倉根一郎：日本脳炎ウイルス国内分離株の遺伝子解析(2005～2009)第58回日本ウイルス学会学術集会 徳島 2010年11月
- G. 知的財産権の出願・登録状況
特になし

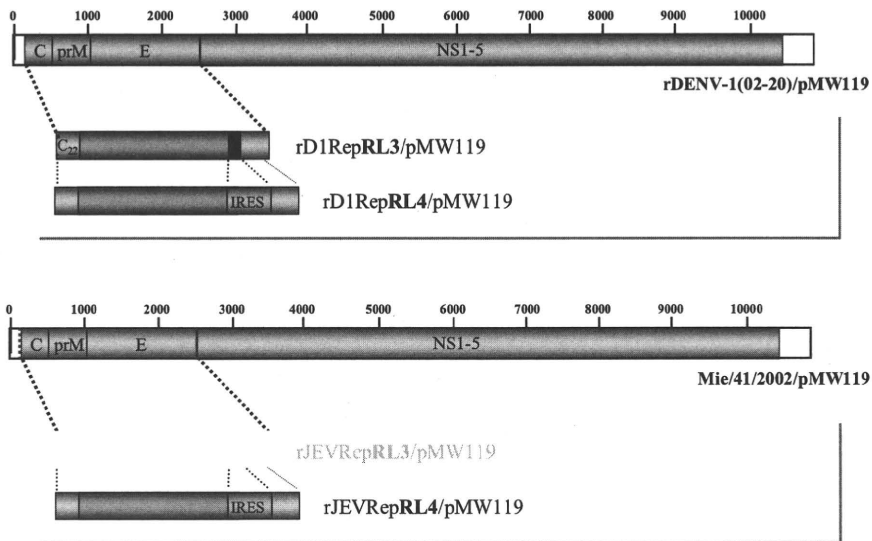


図1 デングリ型ウイルスおよび日本脳炎ウイルスレポーターレプリコンの構築

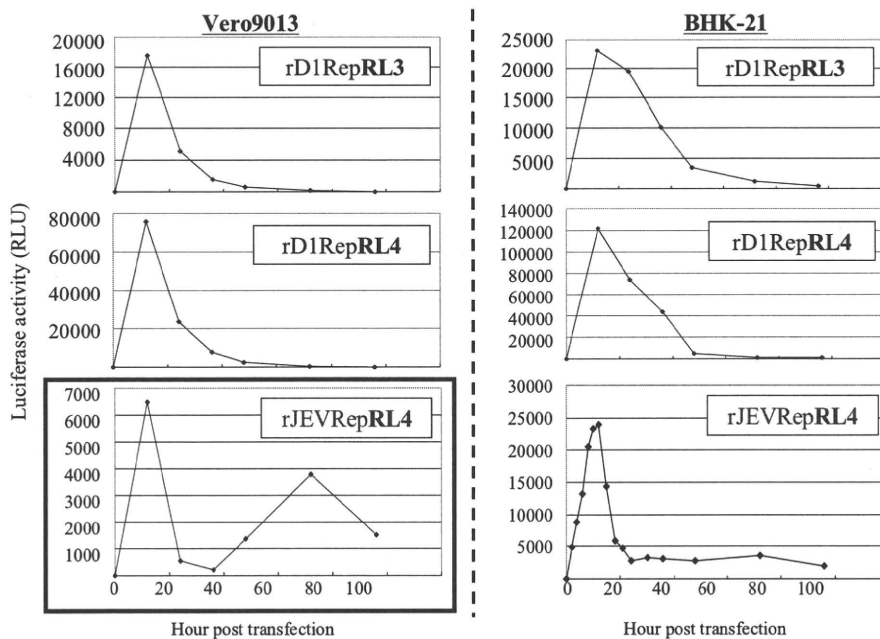


図2 構築したDENV-1およびJEVレプリコンのルシフェラーゼ活性変化

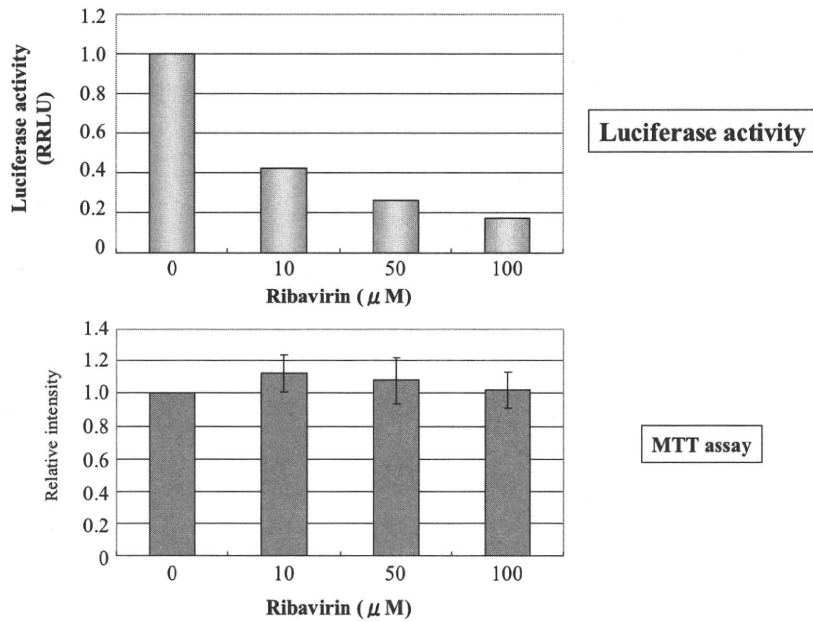


図3 RBV含有培地でのJEVレプリコンのルシフェラーゼ活性

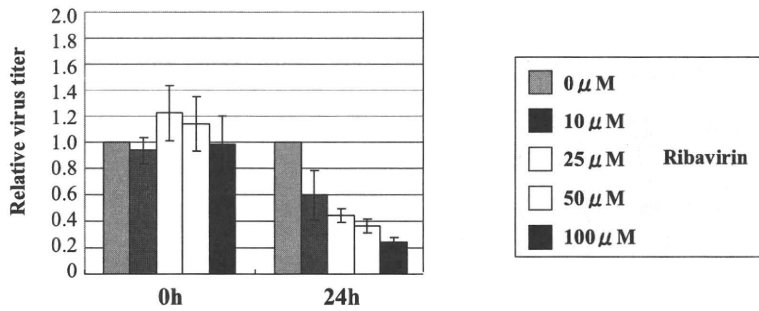
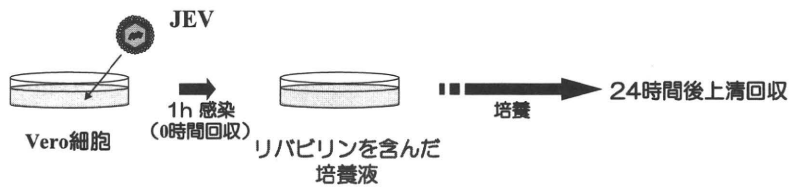


図4 JEVの増殖に対するリバビリンの効果

