

表1. マーモセットにおける DENV-2 接種後の 血球数および化学値

| 検査項目 | 接種後 (日目) | | | | | | | |
|----------------------------------|-------------------------|---------------|--------------|---------------|-----------------|-----------------------------------|------------------------|-------------------|
| | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 7 | 14 | 21 |
| (A) DENV-2 接種 (12 個体) | | | | | | | | |
| 血小板($\times 10^4/\mu\text{l}$) | 45 (11-66) ^d | n.d.* | 40 (25-62) | 49 (40-57) | 38 (25-61) | 40 (20-60) | 53 (25-77) | 55 (26-79) |
| 白血球($\times 10^4/\mu\text{l}$) | 64 (29-88) | n.d. | 51 (26-82) | 50 (44-54) | 41 (22-55) | <u>44</u> (22-57) [†] | 57 (40-86) | 53 (22-77) |
| AST (IU/l) | 86 (58-167) | n.d. | 94 (56-156) | 105 (73-196) | 88 (63-133) | <u>79</u> (42-133) | <u>67</u> (43-132) | <u>61</u> (42-92) |
| ALT (IU/l) | 6 (0-21) | n.d. | 11 (1-63) | 3 (2-4) | 6 (1-23) | 6 (1-30) | 10 (1-74) | 4 (0-13) |
| LDH (IU/l) | 159 (63-416) | n.d. | 136 (63-296) | 155 (106-205) | 145 (61-244) | <u>184</u> (73-381) | <u>151</u> (67-432) | 122 (55-279) |
| BUN (mg/dl) | 22 (17-29) | n.d. | 21 (15-26) | 34 (24-51) | 22 (14-29) | 25 (15-33) | 25 (17-32) | 23 (13-32) |
| (B) Mock (4 個体) | | | | | | | | |
| 血小板($\times 10^4/\mu\text{l}$) | 47 (34-62) | 53 (40-61) | n.d. | 54 (40-63) | n.d. | 60 (41-73) | 59 (34-73) | 58 (38-69) |
| 白血球($\times 10^4/\mu\text{l}$) | 48 (42-54) | 58 (52-70) | n.d. | 54 (49-60) | n.d. | 70 (53-90) | 51 (41-58) | 43 (32-54) |
| AST (IU/l) | 77 (36-121) | 107 (101-114) | n.d. | 73 (68-81) | n.d. | 46 (41-53) | 44 (34-60) | 40 (35-48) |
| ALT (IU/l) | 9 (0-20) | 4 (1-10) | n.d. | 3 (0-8) | n.d. | 1 (0-3) | 2 (1-3) | 1 (0-3) |
| LDH (IU/l) | 221 (53-402) | 147 (102-222) | n.d. | 94 (65-137) | n.d. | 76 (50-114) | 80 (55-111) | 102 (48-221) |
| BUN (mg/dl) | 24 (21-28) | 22 (20-25) | n.d. | 22 (19-28) | n.d. | 23 (17-27) | 24 (17-28) | 21 (18-24) |

* 血液採取が行われなかった (n.d.), [†] Mock と比較して、有意差が認められた ($P < 0.05$)

図1. マーモセット 16 個体における DENV 接種による生化学および血球数の解析。DENV 接種グループ(A-L, 16 個体) と Mock マーモセット(M-P, 4 個体)と比較して、ウイルス接種マーモセット(D2-2, D2-3, D2-4, D2-5, D2-7, D2-8, D2-8, D2-9, D2-11 と D2-12)では、血小板減少症、白血球減少症、肝機能および腎臓機能上昇 (GOT, LDH, BUN) を認めた。血小板数($\times 10^4/\mu\text{l}$) (○), 白血球数 ($\times 10^2/\mu\text{l}$) (□), AST 値(IU/l) (●), ALT 値(IU/l) (▲), LDH 値(x) (IU/l), BUN 値 (■) (mg/dl) .

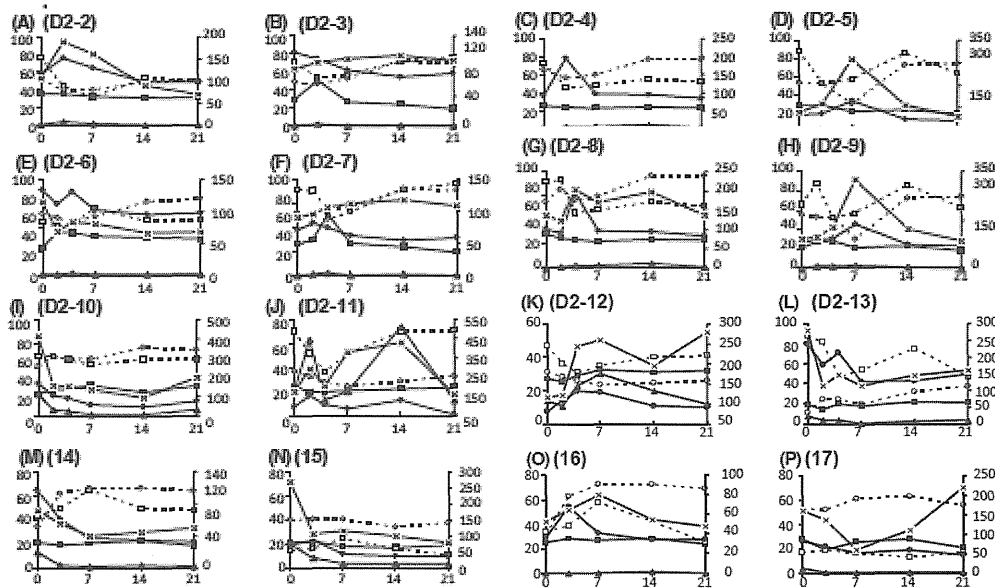


図2. マーモセット 12 個体における体温および活動の変動解析。日内の体温・活動変動は、DENV 接種 0 日～10 日目測定を行った。DENV 接種マーモセット (D2-2, D2-3, D2-4, D2-5, D2-7, D2-9, D2-10, D2-11, D2-12) では、発熱 (ウイルス接種前の体温+2 S.D., ▼) または活動低下 (Δ) が認められた。線は明期 (○) および暗期 (●) における体温を示す。バーは明期 (□) および暗期 (■) における活動を示す。

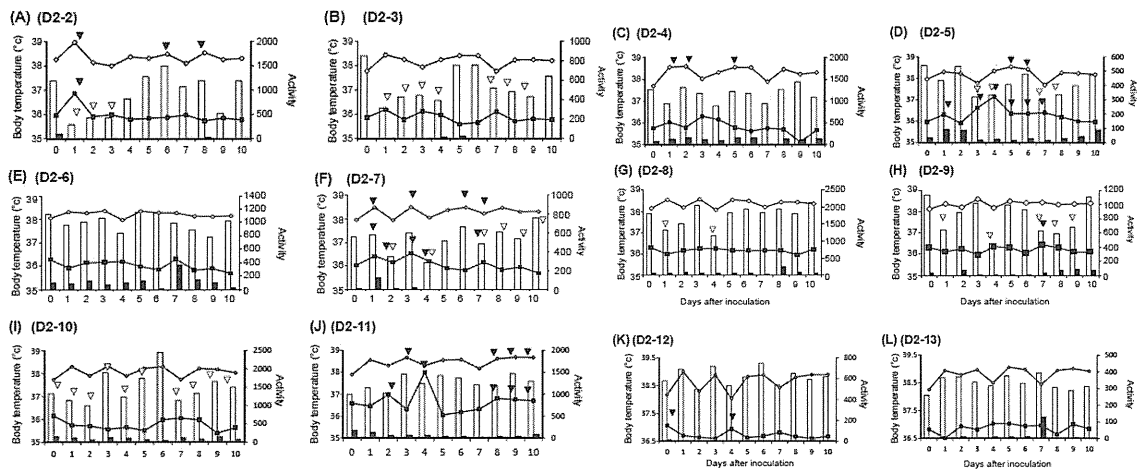


表2. ウイルス接種マーモセットにおける中和抗体の解析。

| マーモセット | 中和抗体価 (PRNT50) | | | | | | | |
|--------|------------------|--------|--------|--------|----------------|--------|--------|--------|
| | 非 FcγR 発現 BHK 細胞 | | | | FcγR 発現 BHK 細胞 | | | |
| | DENV-1 | DENV-2 | DENV-3 | DENV-4 | DENV-1 | DENV-2 | DENV-3 | DENV-4 |
| D2-14 | <20 | 10 | 40 | 40 | <20 | 10 | 20 | <20 |
| D2-15 | 20 | 10 | 80 | 40 | <20 | 10 | <20 | 20 |
| D2-16 | 40 | 10 | 40 | 40 | <20 | 10 | <20 | 40 |
| D2-17 | <20 | 10 | 20 | 20 | <20 | 10 | <20 | 40 |

分担研究報告書

日本脳炎ウイルス感染マウスにおける脳炎発症にかかわる
脳内浸潤 T 細胞の解析

研究分担者 鈴木 隆二 国立病院機構相模原病院 臨床研究センター 室長
研究協力者 白井 颯治 国立感染症研究所ウイルス第一部
北浦 一孝 国立感染症研究所ウイルス第一部
早坂 大輔 長崎大学熱帯医学研究所ウイルス学分野

研究要旨： 日本脳炎ウイルス（JEV）は我が国にすでに広く分布しており、ワクチン接種が進められている感染症の一つである。侵入が危惧されている蚊媒介性ウイルス疾患にはチクングニヤウイルスやデングウイルスなどワクチンを含め有効な発症後の治療薬が存在しないものが多い。その理由の一つとしてこれらのウイルスは感染モデルが確立されていないことがあげられる。そこで本研究ではすでに感染モデルが確立されている日本脳炎ウイルスを用いて感染後の発症率や重症度の違いを解析した。その結果重症群と軽症群では脳内に浸潤してくる T 細胞のレパートリーが異なっていることが明らかになった。またそれに伴って細胞障害活性因子やサイトカインバランスも重症群ではより Th1 側に偏ることが明らかとなった。これらの知見は日本脳炎ウイルスを含むフラビウイルス感染症において感染後の重症度判定や治療法の開発に有用であることが示唆された。

A. 研究目的

蚊によって媒介される日本脳炎ウイルス（JEV）はフラビウイルス科に属し、蚊や人、豚の間で感染感が成立する。蚊の吸血によりヒトへ感染し、軽い発熱から急性熱性疾患、致死的な脳炎などの疾病を起こす。重篤化した際には脳炎を代表とした神経症状を呈し、高い致死性を示す。しかしながら重篤化のメカニズムに関しては不明な点が多い。こうしたフラビウイルス族感染症の生存率や致死率決定因子の詳細な検討はいまだに少ない。JEV の Ja0ArS982（S982）株を用いたマウス脳炎モデルでは、ウイルス接種量に関わらず一貫して 30%程度の致死率を示すことが知られているおり、感染後の重症度判定には体重変化が利用できる。感染日の体重を 1 として感染後（dpi）13 日に 25%以上の体重減少を認めたものを Dying 群、減少が 10%以下のものを Surviving 群と判断する（図 1A、B）。Surviving 群と Dying 群で同等量のウイルスが脳内に存在するなど（図 1C）、致死率や重症度の決定には生体側の防御因子の可能性が示唆されており、我々はすでに脳炎時

において Surviving 群と Dying 群の間に TNF- α や IL-10 の発現量の違いがあることを報告している。本研究では抗原認識において重要な役割を果たし、それらサイトカインを調節している脳内浸潤 T 細胞の免疫調節能に着目し JEV S982 株を用いた脳炎モデルマウスを用いて、体重変化を指標とした Surviving 群と Dying 群の T 細胞の Clonotype を検討した。

B. 研究方法

(1) 動物感染実験：JEV は S982 株を使用し、7 週雌 C57B/6j マウスに感染させ、13dpi に脳と脾臓を採取した。

(2) T 細胞の特異性解析：脳と脾臓から total RNA を抽出し、JEV 感染による T 細胞の抗原特異性を評価するため、TCR レパトア解析、相補性決定領域 3 (CDR3) size spectratyping、CDR3 アミノ酸配列解析を実施した。JEV および TBEV で同様の解析により得られた結果を基に、ウイルス間における脳内浸潤 T 細胞の特異性を比較した。

(3) リアルタイム PCR：リアルタイム定量逆転写ポリメラーゼ連鎖反応（RT-PCR）を用い

て細胞性免疫にかかわる各種マーカーの発現量を定量するとともにサイトカインバランスを解析した。

(倫理面への配慮)

動物実験は、国立感染症研究所および国立病院機構相模原病院 臨床研究センターにおける実験動物委員会のガイドラインにしたがって実施した。

C. 研究結果

感染日の体重を1として感染後 (days post infection:dpi) 13日に25%以上の体重減少を認めたものをDying群、減少が10%以下のものをSurviving群と判断する(図1A、B)。Surviving群とDying群で同等量のウイルスが脳内に存在した(図1C)。

(1) TCR レパトア解析で、JEV 感染マウスの脳では、TCRAV8-1、10-1、BV2-1が有意に増加していた(図-2)。しかしその増加の程度はSurviving群とDying群で差は見られなかった。最も顕著な増加が見られたTRAV8-1に対してCDR3 size spectratyping解析を行った結果、高いクローナリティーが認められた(図-3)。

CDR3 アミノ酸配列解析で、重症群では複数の同一クローンを個体間で認められ、そのクローンの一部は軽症群にも確認された。しかし軽症群では群に共通するクローンは認められなかった(図-3)。次いでJ遺伝子の発現パターンを解析した結果、Surviving群とDying群では異なるJ遺伝子の使用率がそれぞれ高くなっていることが確認された(図-4)。

(2) リアルタイムPCR解析で、Mock群の脳と比較して感染マウスの脳ではCD3、CD8、CD25 (IL-2R)、CD69、Perforin、Granzyme A、Granzyme Bの発現レベルが増加した(図-5)。Surviving群と比較するとDying群ではPerforin、Granzyme A、Granzyme Bが有意に上昇していた。また脳内サイトカインバランスを測定した結果、脳内サイトカインバランスは感染後徐々にTh1側に偏っていった(図-6)。しかし体重により予後判定のできる13dpiではDying群ではSurviving群と比較してよりTh1側に偏っていた。

D. 考察

これまで我々は、JEV感染により脳内に浸潤したT細胞のTCRレパトア解析の結果から、ウイルス感染により特異的T細胞が存在する

ことを示してきた。しかし、ウイルス感染後に観察される生体の重症度に対して浸潤T細胞の量的および質的な変動がどのように関与していたかは不明のままであった。今回の実験結果から、JEV感染時における脳炎において脳内浸潤T細胞の質的变化が重症度と関連していることをあきらかにした。Surviving群とDying群では共に共通したTCRレパトアファミリーのskewが確認された。しかしながらDying群においては個体間に共通するクローンが高頻度に確認され、さらにSurviving群ではDying群に確認されたクローンは少数しか存在していなかった。

Surviving群で特徴的なことは、共通したJ鎖が高頻度で使用されていることであった。さらにリアルタイムPCRの解析結果から、JEV感染マウス脳内はMock群のそれと比較してTh1サイトカインバランスを呈し、その偏りは11dpiまで徐々に増加していた。しかし13dpiでDying群はSurviving群と比較してよりTh1側に偏ることが確認された。

E. 結論

ウイルス感染により異なる病態を示す群間で、ウイルス感染免疫に重要な役割を示すT細胞のクローンレベルでの変化がこれらの表現型に関与している可能性がある。今後は今回検討したもの以外のVファミリーのクローンレベルの詳細な検討を行うとともに、サイトカインレベルに関与する制御性T細胞関連因子にも着目し感染後の予後決定因子を検索する必要がある。

F. 健康危険情報

特記事項なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

白井顕治、北浦一孝、早坂大輔、高崎智彦、鈴木隆二、倉根一郎：日本脳炎ウイルス感染マウスにおける脳炎発症にかかわる脳内浸潤T細胞の解析 第60回日本ウイルス学会学術集会 2012年11月13-15日

早坂大輔、青木康太郎、北浦一孝、白井顕治、Dash Sima Simanti、永田典代、高松由基、鈴木

木隆二、森田公一：日本脳炎ウイルス感染において TNF α は免疫応答を調節し重症化の抑制に働く 第 60 回日本ウイルス学会学術集会
2012 年 11 月 13-15 日

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

1. 特許取得

なし。

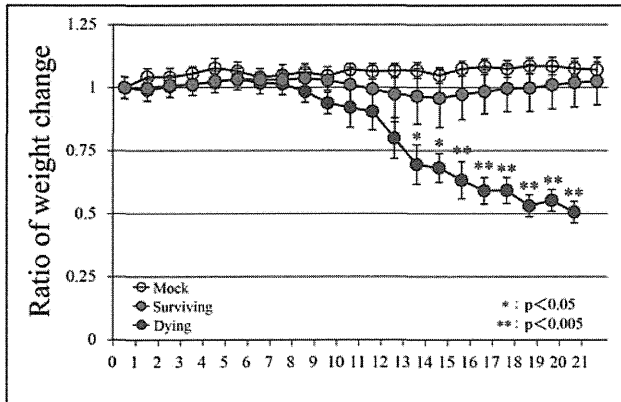
2：実用新案登録

なし。

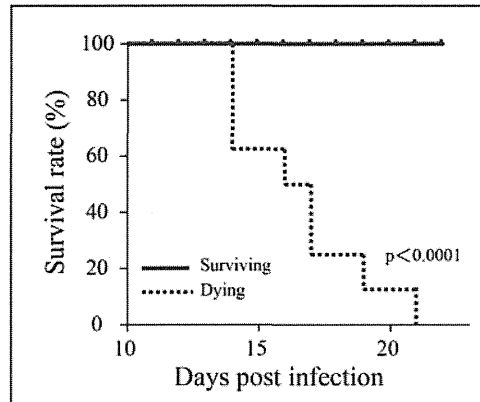
3：その他

なし。

(A)



(B)



(C)

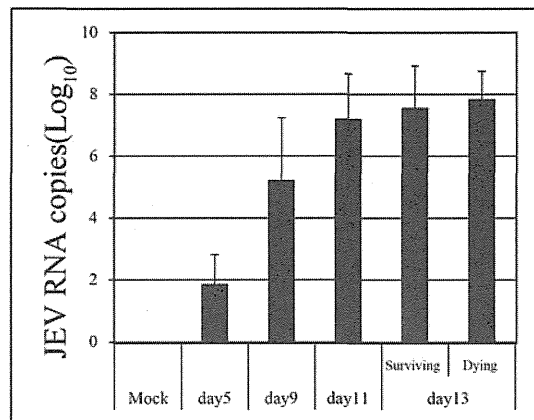


図-1. JEV 感染マウスにおける体重変化による感染マウスの群分けと脳内 JEV RNA 測定。(A) ウイルス感染日(0 dpi)の体重を 1 として 13dpi に 25%以上減少を認めたものを Dying 群、減少が 10%以下のものを Surviving 群として実験を行った。(B) 13dpi 以降、Dying 群と Surviving 群の生存比率には顕著な優位さが認められる。(C) リアルタイム PCR を用いた脳内 JEV RNA コピー数を検出した。

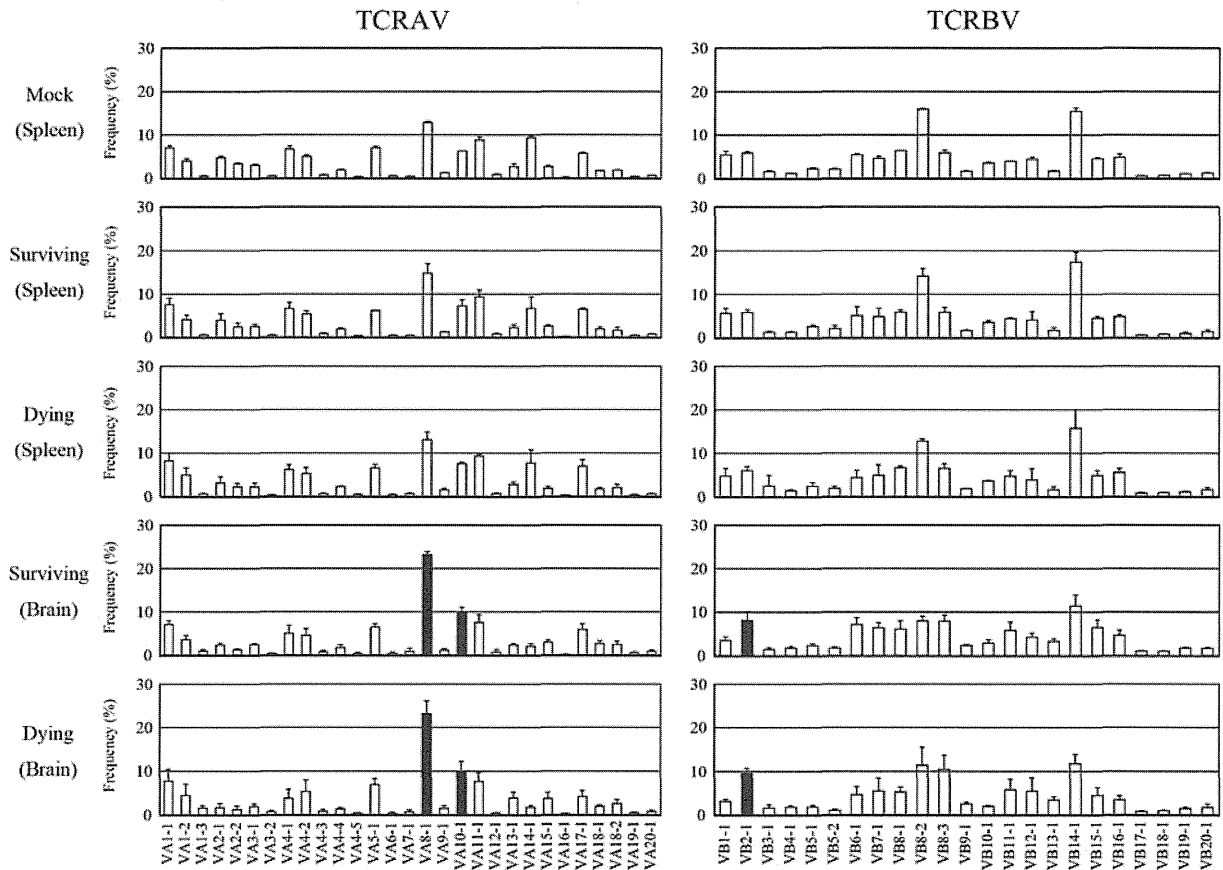


図-2. JEV 感染マウスにおける TCR レパトア解析。TCR レパトア解析では Mock 脾臓を基準として、JEV 感染マウス脳で有意 (Student's *t*-test, $p < 0.05$) に増加が認められたファミリーを黒棒で示した。

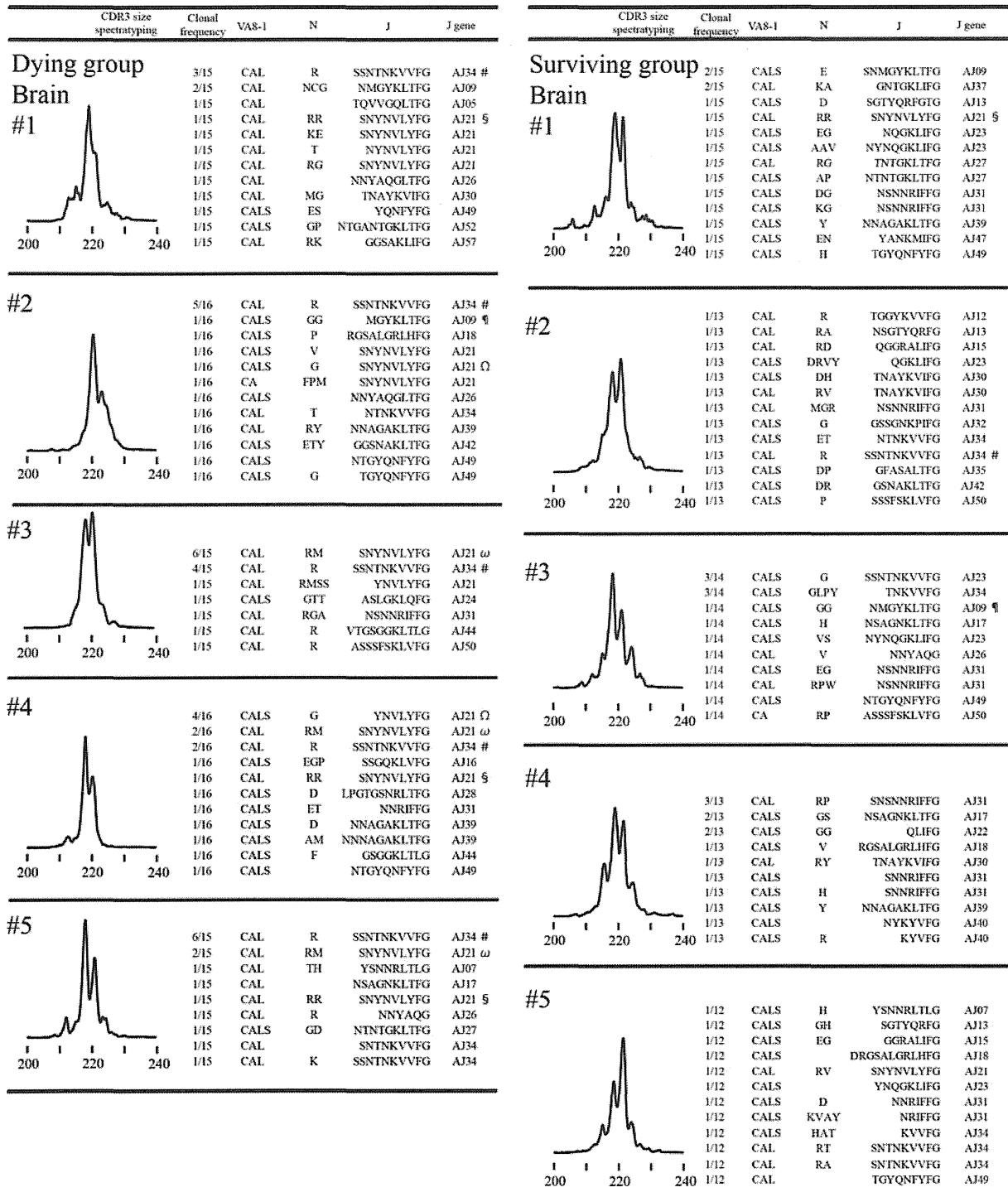


図-3. JEV 感染マウスにおける CDR3 サイズスペクトラタイピングとシーケンス解析。TCR レパトア解析により、偏りが認められた VA8-1 において CDR3 サイズスペクトラタイピング（波形データ）を実施した結果、個体間で類似したピークを認めた。シーケンス解析によって得られた塩基配列をアミノ酸配列に変換したのち、V 領域 3' 末端、N 領域、J 領域を詳細に検討した。同一配列にシンボルをつけている。

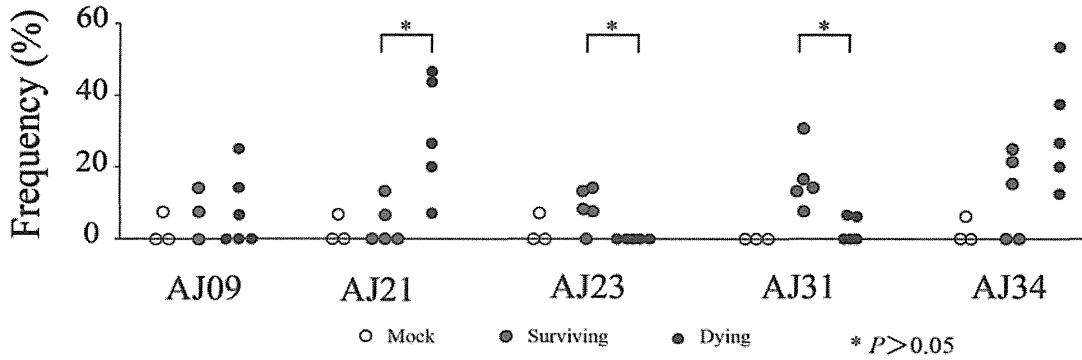


図-4. Surviving 群と Dying 群における J 遺伝子の発現パターンの解析。J 遺伝子の発現パターンを解析した結果、Surviving 群と Dying 群では異なる J 遺伝子の使用頻度が高くなっていることが分かった。有意な上昇 (Student's *t*-test, $p < 0.05$) を認めた群にシンボル (*) をつけている。

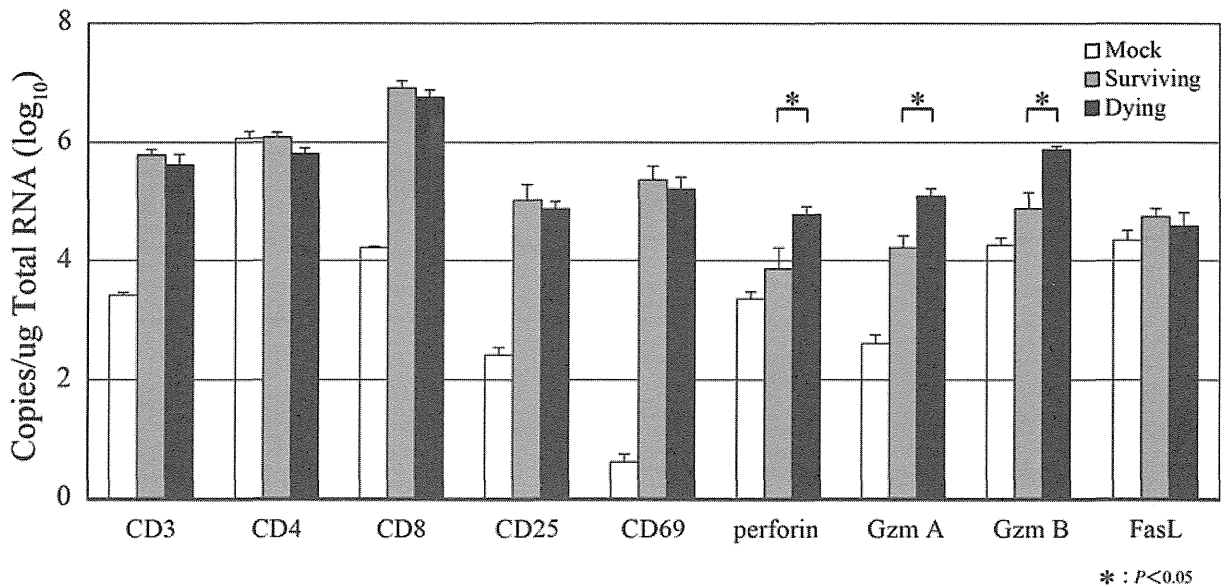


図-5. リアルタイム PCR 解析。JEV 感染群 (Surviving 群、Dying 群) の脳で Mock 群に対して CD3、CD4、CD8、Peforin、Granzym A、Granzym B の上昇を認めた。さらに Surviving 群と Dying 群の間に有意な差 (Student's *t*-test, $p < 0.05$) を認めた群にシンボル (*) をつけている。

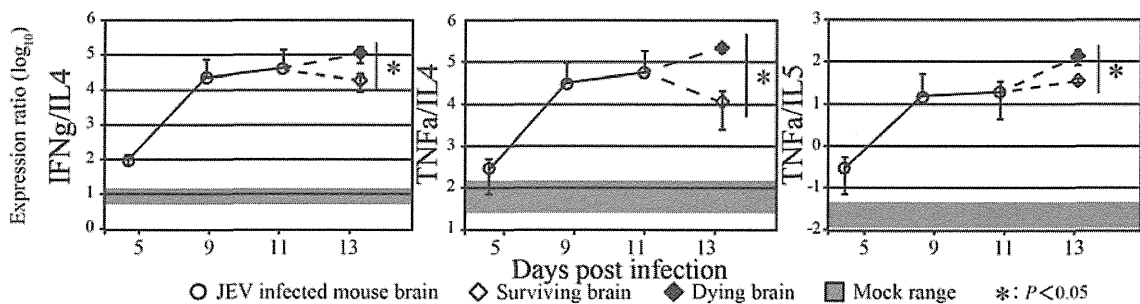


図-6. 脳内サイトカインバランス解析。Mock 群と比較して感染群の脳内サイトカインバランスは感染後徐々に Th1 側に偏っていった。体重により予後判定のできる 13 dpi において Surviving 群と Dying 群の間に有意差 Student's *t*-test, $p < 0.05$) が認められた。

厚生労働科学研究費補助金（新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業）
「我が国への侵入が危惧される蚊媒介性ウイルス感染症に対する
総合的対策の確立に関する研究」（H23-新興-一般-010）

分担研究報告書

コモンマーモセットにおける定量リアルタイム PCR 解析系の開発に関する研究

研究分担者 鈴木 隆二 国立病院機構相模原病院 臨床研究センター 室長
研究協力者 藤井 克樹 国立感染症研究所ウイルス第一部
北浦 一孝 国立感染症研究所ウイルス第一部
白井 顕治 国立感染症研究所ウイルス第一部

研究要旨： 我が国への侵入が危惧される蚊媒介性ウイルス感染症のうち、デングウイルスやチクングニヤウイルスは、代表的なげっ歯類の実験動物であるマウスへの感染が成立せず、よりヒトに近い動物での感染モデル作成が急務となる。コモンマーモセット（*Callithrix jacchus*, マーモセット）は、代表的な非ヒト霊長類の実験動物であり、これまでに上記ウイルスの感染が成立することを報告している。しかしながら免疫学的解析系が確立しておらず、抗体やゲノム情報も限定される。したがって本研究では、種々の免疫関連遺伝子発現量を評価する唯一の方法として、mRNA をベースにした解析手法である定量リアルタイム PCR (qPCR) 解析系の開発を目的とした。また、信頼できる qPCR 法を開発するため、多種類の組織におけるハウスキーピング遺伝子 (HKG) 発現の安定性について *geNorm* ソフトを用いて評価した。さらに末梢血リンパ球における CD 抗原、サイトカイン発現量についてもマーモセットとヒトで比較した。HKG のうち GAPDH、ACTB、SDHA、TBP が全般的に安定して発現した。CD4、IL-4 はヒトよりも低発現であり、IL-10、IL-12 β 、IFN- γ は高発現であった。また Th1/Th2 比は、マーモセットにおいてヒトよりも高値であった。これらの結果より、コモンマーモセットとヒトにおいて、異なる Th1/Th2 バランスが示唆された。したがって疾患モデル動物として使用する際には、宿主防御および疾病に対する感受性に影響を与える可能性を考慮する必要がある。

A. 研究目的

我が国への侵入が危惧される蚊媒介性ウイルス感染症のうち、デングウイルスやチクングニヤウイルスは、代表的なげっ歯類の実験動物であるマウスへの感染が成立せず、よりヒトに近い動物での感染モデル作成が急務となる。新世界猿であるコモンマーモセットは小型で扱いやすく安定供給が可能であり、ヒトとの相同性も高いことから、これまでに神経科学や幹細胞研究、毒性学、自己免疫学、感染症などの分野で有用な実験動物として使用されてきた。これまでの感染実験において、コモンマーモセットがデングウイルスやチクングニヤウイルスに感受性を示すことが見出されたため、感染動物モデルとして利用することが可能である。しかしながら、免疫学的解析系は未だ不十分であり、抗体やゲノム情報も限定される。

DNA マイクロアレイや qPCR を用いた遺伝

子発現解析は、生体の免疫状態を理解するうえで非常に便利であり、複雑な調節機構や病態メカニズムの解析において有益な情報を得ることができる。特に qPCR は、測定範囲や正確性、感受性、特異性、スピードなどの点から優れた定量法である。

また近年、qPCR の評価に関するガイドラインが作成され、異なるサンプルを正確に比較する際に *normalization* として用いる最適なハウスキーピング遺伝子 (HKG) の厳密な選択方法が提唱されている。HKG は実験に用いる組織や細胞、実験条件などに影響を受けないことが重要であるため、評価系として *geNorm*、*NormFinder* という異なるストラテジーを基にした解析ソフトが開発されている。

したがって本研究では、コモンマーモセットにおいて多種類の組織で安定した HKG を選定することを第一の目的とした。さらに末梢血

リンパ球における CD 抗原、サイトカイン発現量についてもマーマセットとヒトで比較検討した。

B. 研究方法

(1) サンプル採取：マーマセット 4 頭より、脾臓、腸間膜リンパ節、空腸、回腸、結腸、大脳、小脳、脳幹、心臓、肺、肝臓、腎臓を採取した。組織は RNAlater に浸漬し-80°C で保管した。またマーマセット 8 頭、健常者より採血を行い、白血球を分離した。

(2) 合成：RNeasy Mini Kit (QIAGEN) を用いてサンプルより total RNA を抽出し、PrimeScript® RT reagent Kit (Takara bio) を用いて cDNA 合成した。

(3) 特異的プライマー：各 HKG および免疫関連遺伝子の特異的プライマーの設計は、ヒトとの比較を行うため、ヒト配列と相同性の高い部分を採用した (表 1、表 2)。

(4) qPCR：解析機器は Bio-Rad CFX96 system (Bio-Rad) を用いた。PCR 反応液は以下のように実施した (SsoFast™ EvaGreen® Supermix : 5 μ L, DW : 3.5 μ L, 5 μ M primer mix : 0.5 μ L, cDNA : 1 μ L)。PCR 温度設計は以下のように実施した (初期変性 : 30 sec 95°C, 増幅反応 : 1 sec 95°C, 5 sec 60°C を 45 サイクル)。コピー数は、配列を確認しているプラスミド DNA クローンをスタンダードに置いて算出した。

(5) フローサイトメトリー：マーマセット、ヒトより分離した PBMC を抗 CD3 抗体 (SP34-2)、抗 CD4 抗体 (マーマ : Mar4-33、ヒト : SK3)、抗 CD8 抗体 (マーマ : Mar8-10、ヒト : HIT8a) で染色し、FACSCalibur (Becton Dickinson) で解析した。

(6) 統計：各免疫関連遺伝子の発現量比較は Student's *t*-test を用い、 $P < 0.05$ を有意とした。

(倫理面への配慮)

動物実験は、国立感染症研究所の実験動物委員会の承認 (610,007) を得て実施した。ヒト末梢血サンプルは、東海大学医学部倫理委員会の承認 (10I-22) を得て、健常者ボランティアより採取した。

C. 研究結果

(1) 各組織における HKG の発現量：8 種類の HKG において各組織における発現量を比

較した (図 1)。最も発現量が多かったのは rRNA で、逆に少なかったのは UBC であり、その差は 10 万倍となった。B2M は心臓と脳で低発現であった。また HPRT は組織間で大きく異なる発現量を示した。

(2) *geNorm* を用いた遺伝子発現安定性の解析：各遺伝子の発現安定性を厳密に調べるため *geNorm* を用いて解析を行った (図 2)。*geNorm* はある遺伝子と他の遺伝子との pairwise variation の平均として定義される M 値に基づいて安定性ランキングを導き出す。M 値が高いほどバラツキが大きいことを示す。さらに、ランキングに沿って pairwise variation を順次計算していくことにより、補正に最適な遺伝子の数を判定することができる。V 値が 0.15 未満であれば、それ以上遺伝子を追加する必要はないと判定する。

マーマセットの M 値は、脾臓、空腸、小脳は他の組織と比べて安定性が低かった。しかし、すべての組織で 8 遺伝子解析時において M 値は 1.5 未満であり、安定性が高いことを示した。V 値は全組織で 2 遺伝子のみで normalization が十分であることを示した。

各組織における HKG 安定性ランキングを図 3 に示した。多くの組織において、GAPDH、ACTB、SDHA、TBP はランキングが高く、逆に HPRT、rRNA、B2M は低かった。

(3) マーマセットとヒト白血球における各免疫関連遺伝子の発現比較：CD4、IL-4 の発現量において、ヒトよりもマーマセットで有意に低値を示したが、IL-10、IL-12 β 、IFN- γ は有意に高値を示した (図 4)。CD8/CD4 比において、マーマセットではヒトよりも有意に高値を示し (図 5)、この傾向はフローサイトメトリーによる結果とも一致し (図 6)、個体の年齢や性別に関わらず共通した (表 3)。さらに IFN- γ /IL-4、IL-2/IL-4 比においてもマーマセットはヒトよりも有意に高値を示し、Th バランスがヒトと異なることを示した。

D. 考察

各組織における HKG の安定性について、発現量の比較および *geNorm* 解析結果より、GAPDH、ACTB、SDHA、TBP が良好であることが判明した。また B2M は、MHC class I 分子の構成タンパクである。そのため通常発現量が低いとされる脳では、炎症に伴い他の細胞が侵入した場合、発現量が大きく変動することが

予想されるため、選択すべきではない。

マーモセットにおける CD8/CD4 比、Th1/Th2 比がヒトと異なったが、これにはいくつかの要因が考えられる。一つ目は衛生環境の違いによって Th1 ヘシフトする可能性である。本実験におけるマーモセットの飼育環境は SPF であるが、未知の微生物感染における影響も考慮すべきであろう。二つ目は Th1 サイトカイン産生細胞である CD8 陽性 T 細胞が数的に多いためにおこる可能性である。しかしながら、IFN- γ 以外の Th1 サイトカイン発現量に差が認められなかったことから、可能性は低いものと思われる。三つ目は遺伝子変異による可能性である。IL-4、IL-10、IL-12 β 、TNF- γ のプロモーター領域および近位領域において、ヒトとマカク属の猿の遺伝子変異が、サイトカインの産生に影響を与えることが知られている。マーモセットのゲノム解析は完了していないため、詳細は不明であるが、宿主防御および疾病に対する感受性に影響を与える可能性がある。

E. 結論

本研究により、コモンマーモセットにおける qPCR 解析系を開発した。各組織における適切な HKG の選択が可能となった。免疫関連遺伝子についても同様に正確な解析が可能となり、今後のウイルス感染マーモセットモデルにおける病態の評価が進展するものと考えられる。

正常組織におけるヒトとの比較検討を行った結果、異なる Th1/Th2 バランスが示唆された。したがって疾患モデル動物として使用する際には、宿主防御および疾病に対する感受性に影響を与える可能性を考慮する必要がある。

F. 健康危険情報

特記事項なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

Fujii Y, Kitaura K, Matsutani T, Shirai K, Suzuki S, Takasaki T, Kumagai K, Kametani Y, Shiina T, Takabayashi S, Katoh H, Hamada Y, Kurane I, Suzuki R. : Immune-related gene expression profile in laboratory common marmosets assessed by an accurate quantitative real-time PCR using selected reference genes. PLOS ONE. e56296 (2013)

2. 学会発表

なし。

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

1: 特許取得

なし。

2: 実用新案登録

なし。

3: その他

なし。

表 1. qPCR におけるハウスキーピング遺伝子特異的プライマー

| Target gene | Species | 5'-primer sequence -3' ^{a),b)} | | Product size (bp) | PCR efficiency | Reference |
|-------------|---------|---|-------------------------|-------------------|----------------|--------------|
| | | Forward | Reverse | | | |
| GAPDH | Cj | TCGGAGTCAACGGATTGGTC | TTCCCGTTCTCAGCCTTGAC | 181 | 0.920 | DD279474 |
| | Hs | ----- | ----- | 181 | 0.921 | AF261085 |
| ACTB | Cj | GATGGTGGGCATGGGTCAGAA | AGCCACACGCAGCTCGTTGT | 163 | 0.901 | DD279463 |
| | Hs | ----- | -----A---- | 163 | 0.883 | NM_001101 |
| HPRT | Cj | ATCCAAAGATGGTCAAGGTCG | GTATTCATTATAGTCAAGGCATA | 134 | 0.842 | DD289567 |
| | Hs | ----- | ----- | 134 | 0.880 | M31642 |
| B2M | Cj | CTATTCAGCATGCTCCAAAGA | AAGACAAGTCTGAATGCTCCAC | 168 | 0.928 | AF084623 |
| | Hs | ----C----G-A----- | ----- | 168 | 0.950 | AB021288 |
| UBC | Cj | TCCCTTCTCGGCGGTTCTG | . TGCATTGTCAAGCGCGAT | 158 | 0.922 | AB571242 |
| | Hs | -----A----- | TC-----T-A---- | 160 | 0.936 | NM_021009 |
| rRNA | Cj | CGACCATAAACGATGCCGAC | GGTGGTGCCCTTCCGTCAAT | 145 | 0.918 | AB571241 |
| | Hs | ----- | ----- | 145 | 0.940 | M10098 |
| SDHA | Cj | TGGGAACAAGAGGGCATCTG | CCACCACGGCATCAAATTCATG | 86 | 0.934 | XM_002745154 |
| | Hs | ----- | -----T----- | 86 | 0.948 | BC001380 |
| TBP | Cj | CCATGACTCCCAGGAATCCCTAT | ATAGGCTGTGGGGTCAGTCCA | 70 | 0.920 | EU796973 |
| | Hs | ----- | ----- | 70 | 0.954 | M55654 |

^{a)} Hyphen indicates a nucleotide identical to human sequences.

^{b)} Dot indicates a shift nucleotide to marmoset sequences.

表 2. qPCR における免疫関連遺伝子特異的プライマー

| Target gene | Species | 5'-primer sequence -3' ^{a)} , ^{b)} | | Product size (bp) | PCR efficiency | Reference |
|-------------|---------|--|----------------------------|-------------------|----------------|--------------|
| | | Forward | Reverse | | | |
| CD3ε | Cj | GGCTTGCTGCTGCTGGTTTAC | CCGGATGGGCTCATAGTCTG | 150 | 0.865 | DQ189218 |
| | Hs | ----- | ----- | 150 | 0.848 | NM_000733 |
| CD4 | Cj | GGAAAACGGGAAAGTTGCATCA | GCCTTCTCCCGCTTAGAGAC | 163 | 0.926 | AF452616 |
| | Hs | C-----A----- | -----C----- | 162 | 0.907 | M35160 |
| CD8α | Cj | TCTCCCAAACCAAGTCCAAGG | AGTTTCTCAGGGCCGAGCAG | 144 | 0.940 | DQ189217 |
| | Hs | -----A---C----- | . ---G----- | 143 | 0.912 | NM_001768 |
| CD20 | Cj | GGGCTGTCCAGATTATGAATG | GAGTTTTTCTCCGTTGCTGC | 166 | 0.942 | DQ189220 |
| | Hs | ----- | ----- | 166 | 1.002 | X07203 |
| IL-1β | Cj | TGCACCTGTACGATCCCTGAAC | TTGCACAAAGGACATGGAGAACAC | 145 | 0.806 | AB539804 |
| | Hs | -----A----- | ---T----- | 145 | 0.780 | NM_000576 |
| IL-2 | Cj | CCCAAGAAGGCCAAAGAATTG | CTTAAGTGAAAGTTTTTGCTTTGAG | 104 | 0.773 | DQ826674 |
| | Hs | -----C---C--- | ----- | 103 | 0.797 | BC070338 |
| IL-4 | Cj | CATTGTCACAGAGC AAAAGACTC | CTCAGTTGTGTTCTTGGAGGCA | 79 | 0.910 | XM_002744606 |
| | Hs | . GCC-----G----- | ----- | 77 | 0.878 | NM_000589 |
| IL-5 | Cj | AATCACCAACTGTGCACTGAAGAA | . TTTGGCGGTCAATGTGTTCCCTT | 130 | 0.871 | DQ658152 |
| | Hs | ----- | TT-----C-----A--T--- | 132 | 0.860 | NM_000879 |
| IL-6 | Cj | GATTCAATGAGGAGACTTGCC | TGTTCTGGAGGTACTCTAGGTA | 81 | 0.920 | DQ658153 |
| | Hs | ----- | ----- | 81 | 0.990 | NM_00600 |
| IL-10 | Cj | CTGCCTCACATGCTTCGAGA | TGGCAACCCAGGTAACCCTTA | 134 | 0.970 | DQ658154 |
| | Hs | -----A----- | ----- | 134 | 0.920 | M57627 |
| IL-12β | Cj | . GGACGGCAAGGAGTATGAGTA | TTGAGCTTGTAACGGCATC | 111 | 0.935 | AB539805 |
| | Hs | G---AA----- | ----- | 112 | 0.900 | M65272 |
| IL-13 | Cj | TCCAGCTTGCTGTCCGAG | CTGCAAATAATGATGCCGTT-GATGT | 127 | 0.916 | AB571243 |
| | Hs | -----A----- | . -----T--C--A- | 127 | 0.964 | NM_002188 |
| IFN-γ | Cj | GGGTTCTCTTGCTGTTACTG | TGCTAAGAAAAGAGTTCATTATC | 116 | 0.838 | FJ598593 |
| | Hs | ----- | . -C----- | 115 | 0.856 | NM_000619 |
| TNF-α | Cj | AGCCTGTAGCCCATGTTGTAG | CTCTCAGCTCCACGCCATTG | 102 | 0.887 | DQ520835 |
| | Hs | ----- | ----- | 102 | 0.817 | NM_000594 |

^{a)} Hyphen indicates a nucleotide identical to human sequences.

^{b)} Dot indicates a shift nucleotide to marmoset sequences.

表 3 マーモセット PBMC における年齢間の CD8/CD4 比の比較

| Age | Sex | % positive | | CD8/CD4 ratio |
|-----------|--------|------------|------------|---------------|
| | | CD8 | CD4 | |
| 3 month* | male | 58.3 | 38.4 | 1.52 |
| 1.5 year | female | 60.7 | 36.1 | 1.68 |
| 1.5 year* | male | 55.1 | 41.5 | 1.33 |
| 2.0 year | male | 52.7 | 44.6 | 1.18 |
| 10 year* | female | 58.6 | 37.8 | 1.55 |
| Mean ± sd | | 57.1 ± 3.2 | 39.7 ± 3.4 | 1.45 ± 0.20 |

* Only FACS analysis, but not qPCR, was done with PBMCs from these three marmosets.

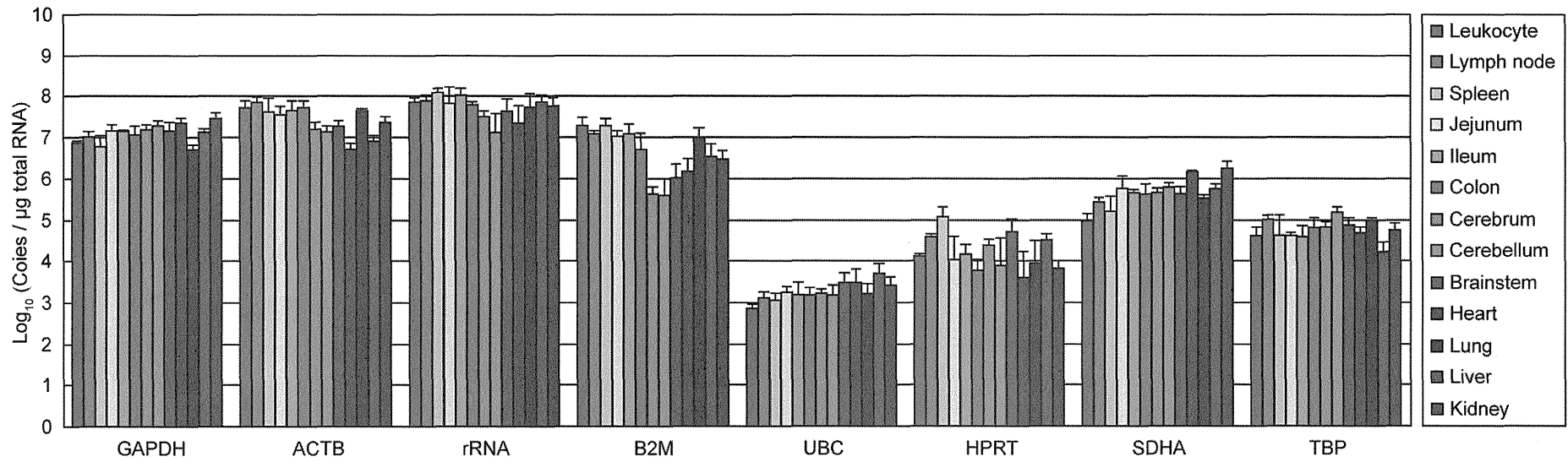


図 1. 各組織における HKG 発現量 (1μg Total RNA あたりのコピー数)

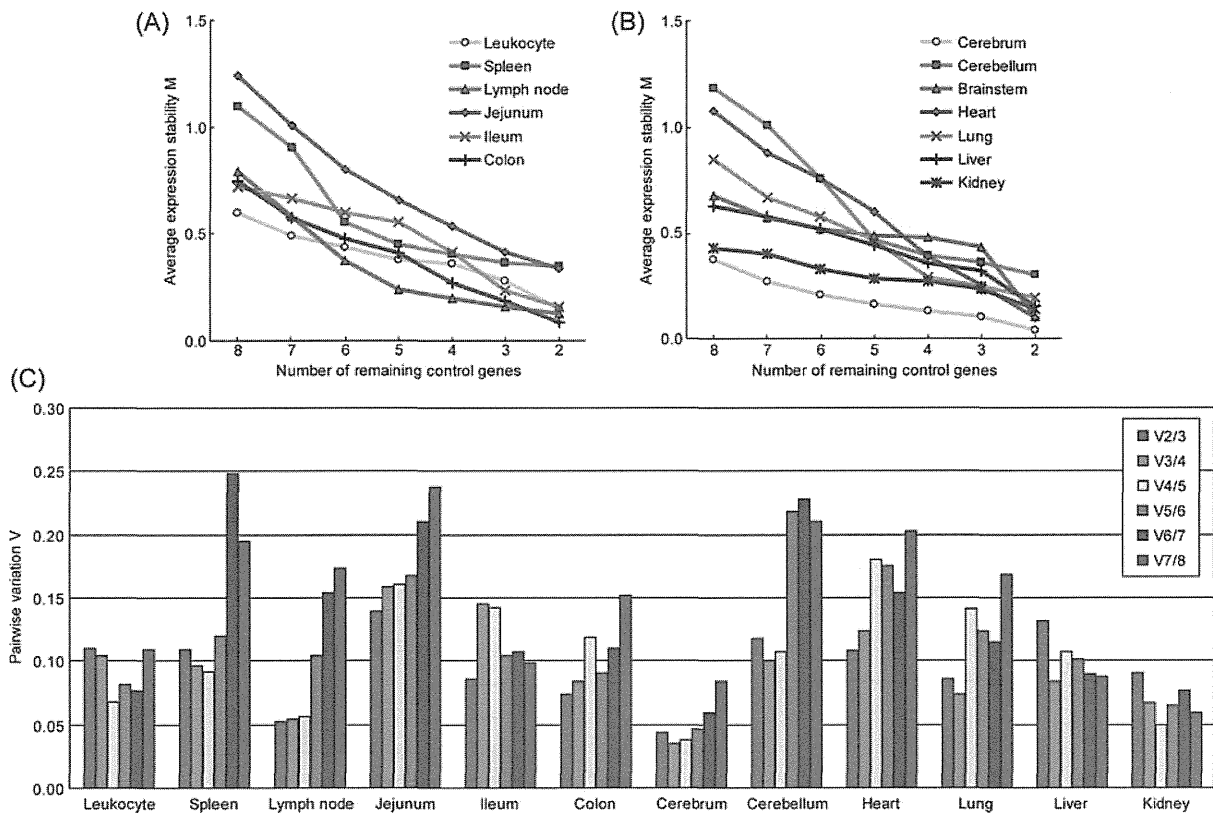


図 2. *geNorm* を用いた遺伝子発現安定性の解析

| Stability | High | | | | | | | Low |
|------------|------------|-------|-------|------|-------|-------|------|------|
| Leukocyte | GAPDH-UBC | ACTB | SDHA | TBP | B2M | rRNA | HPRT | HPRT |
| Spleen | GAPDH-SDHA | ACTB | TBP | UBC | rRNA | B2M | HPRT | HPRT |
| Lymph node | rRNA-TBP | ACTB | SDHA | UBC | GAPDH | B2M | HPRT | HPRT |
| Jejunum | UBC-TBP | GAPDH | B2M | SDHA | ACTB | rRNA | HPRT | HPRT |
| Ileum | B2M-TBP | UBC | ACTB | HPRT | SDHA | GAPDH | rRNA | rRNA |
| Colon | ACTB-TBP | SDHA | GAPDH | rRNA | UBC | HPRT | B2M | B2M |
| Cerebrum | GAPDH-SDHA | rRNA | ACTB | HPRT | UBC | TBP | B2M | B2M |
| Cerebellum | SDHA-TBP | GAPDH | ACTB | UBC | rRNA | B2M | HPRT | HPRT |
| Brainstem | ACTB-SDHA | UBC | rRNA | HPRT | GAPDH | TBP | B2M | B2M |
| Heart | SDHA-TBP | GAPDH | ACTB | UBC | B2M | rRNA | HPRT | HPRT |
| Lung | SDHA-TBP | ACTB | GAPDH | UBC | B2M | rRNA | HPRT | HPRT |
| Liver | GAPDH-SDHA | HPRT | rRNA | ACTB | TBP | UBC | B2M | B2M |
| Kidney | GAPDH-SDHA | TBP | UBC | ACTB | B2M | rRNA | HPRT | HPRT |

図 3. 各組織における HKG 安定性ランキング

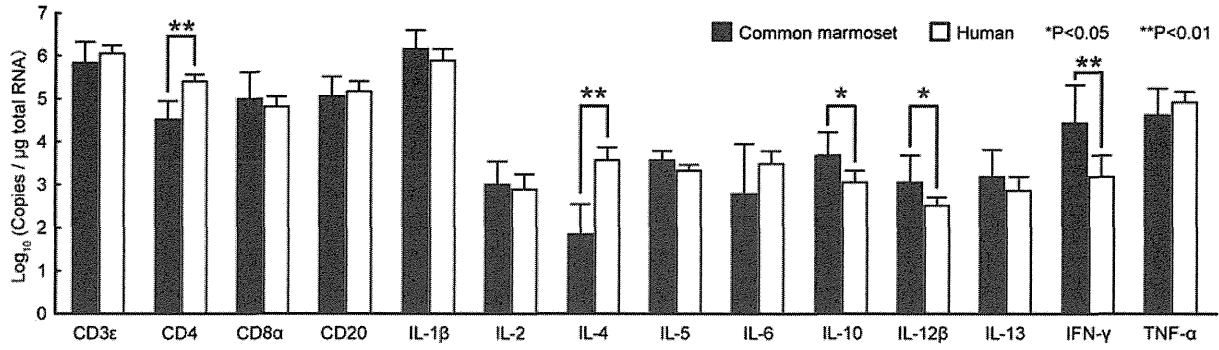


図 4. マーモセットとヒト白血球における各免疫関連遺伝子の発現比較

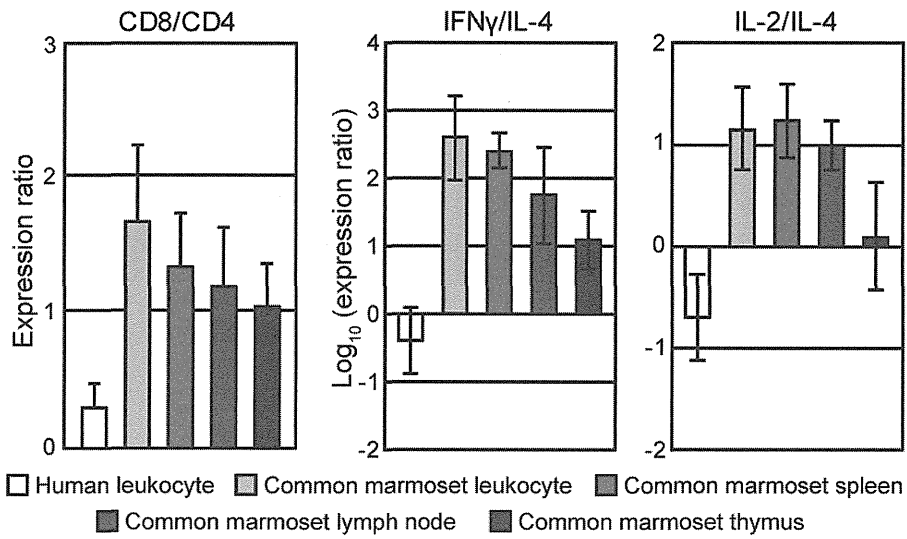


図 5. マーモセットとヒト白血球における Th1/Th2 発現比率の比較

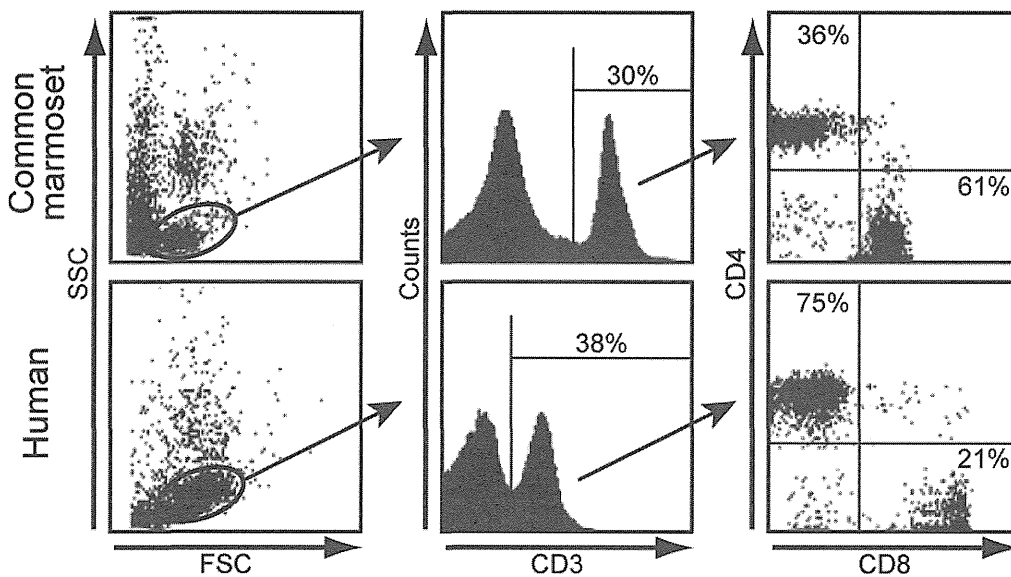


図 6. マーモセットとヒト白血球における CD4、CD8 陽性 T 細胞の分布

分担研究報告書

ジェノタイピング法による媒介蚊の殺虫剤感受性評価の検討

研究分担者 澤邊京子 国立感染症研究所・昆虫医科学部
研究協力者 比嘉由紀子 長崎大学熱帯医学研究所
葛西真治 国立感染症研究所・昆虫医科学部

研究要旨

我が国で蚊媒介性感染症が流行した場合には、媒介蚊の殺虫剤感受性の状況を迅速に把握し、現場で最も効力を発揮する殺虫剤を用いて媒介蚊を効率よく防除することが求められる。殺虫剤抵抗性遺伝子の変異領域をターゲットにしたジェノタイピング法は簡便で迅速な解析が可能であるが、実際の薬剤感受性の状況になるべく近い解析結果を導き出すためには、より精度の高い遺伝子変異の組み合わせを選択することが重要になる。

抵抗性個体が広く分布しているフィリピン国内で採集した個体群を用いて解析を行ったところ、薬剤感受性レベルを裏付けるように作用点ナトリウムチャンネルが変異した個体（V1016G および F1534C）が高頻度で見つかった。その一方で、抵抗性レベルが高いにもかかわらず *kdr* 遺伝子頻度が低い集団も確認された。作用点変異を指標にしたジェノタイピング法がある程度薬剤感受性の状況を反映していることが明らかになった一方で、*kdr* 因子以外の抵抗性要因がネッタシマカのピレスロイド系殺虫剤抵抗性に関与していることが示唆された。

今後は、作用点と解毒酵素の双方の突然変異をターゲットとしたジェノタイピング法を検討していく必要があると考えられた。

A. 研究目的

ネッタシマカは世界中の熱帯、亜熱帯地域に分布し、デング熱の主要な媒介蚊であるが、成虫防除に用いられるピレスロイド系殺虫剤に抵抗性を発達させた個体群が世界各地で確認され、問題となっている。媒介蚊対策が殺虫剤による防除に頼らざるを得ない現状から鑑みると、抵抗性の発達はそのまゝ感染症に対するリスクを高めることにつながる。したがって、野外における媒介蚊の殺虫剤感受

性を把握することは、殺虫剤の防除効果を高める上で重要である。しかしながら、殺虫剤を用いた殺虫試験で薬剤感受性を把握するには野外から相当数の生きた個体を収集する必要があるため、時間と労力がかかる。また、数をそろえるために第2世代の個体を試験に用いれば遺伝的な偏りが起こり、実際の感受性を反映できない問題が生じてくる。そこで、薬剤抵抗性遺伝子変異を指標としたジェノタイピング法が確立されれば、野外集団の薬剤

感受性の状況を迅速に、しかも簡便に把握することが可能となる。

ピレスロイド系殺虫剤抵抗性の機構としては、主に3つを挙げることが出来る。①作用点、すなわちナトリウムチャネルのアミノ酸変異による薬剤感受性の低下（ロックダウン抵抗性, *kdr*）、②解毒酵素の活性増大、③薬剤の皮膚透過性の低下、である。これらのうち、これまでナトリウムチャネル遺伝子の変異による抵抗性発達についてはさまざまな害虫種で研究が進み、抵抗性に関与しうるアミノ酸変異が明らかになりつつある。ネッタイシマカにおいても I1011MorV, V1016G, F1534C といった変異が起こることでピレスロイド剤に対する感受性が低下することが報告され（図 1）、これらをターゲットにして作用点変異の頻度を調査することが可能になっている。

幸いなことに、現在の所、我が国においてデング熱、チクングニヤ熱侵入時に媒介蚊として重要であると思われるヒトスジシマカはいずれの殺虫剤に対しても高度の抵抗性を発達させていない。そこで、本研究においては、すでにある程度ピレスロイド系殺虫剤に対して抵抗性を獲得したネッタイシマカの分布が確認されているフィリピン国内で採集した個体群について、ナトリウムチャネル遺伝子をジェノタイプングし、*kdr* 遺伝子頻度を算出した。そして、実際のピレスロイド剤感受性試験の結果と比較し、薬剤感受性と *kdr* 遺伝子頻度との関連を調べることで、*kdr* を指標としたジェノタイプング法が薬剤を用いた殺虫試験法の代替法となり得るのかどうかを検討した。

B. 研究方法

2009 年および 2010 年にフィリピン国内の古タイヤより採集したネッタイシマ

カ幼虫サンプル（エタノールに浸漬）より 1 頭ずつ DNA を抽出し（REDEExtract-N-Amp Tissue PCR Kit, Sigma-Aldrich）、PCR の鋳型とした。4 カ所のアミノ産置換をターゲットとするために、2 組の PCR を行った（図 2）。すなわち、I1011MorV, L1014F, V1016G, F1534C である。I1011MorV, L1014F, V1016G を検出するために aegSCF20/aeg SCR21 のプライマーセットを用い、F1534C を検出するために aegSCF7/aeg SCR7 のプライマーセットを用いて遺伝子断片を増幅した。また、I1011MorV および L1014F を検出するために aegSCF3 プライマーでシーケンス解析を行い、V1016G を検出するために aegSCR22 プライマーを用いた。また、F1534C を検出するために aegSCR8 プライマーを用いてシーケンス解析を行った。プライマー配列は表 2 の通りである。

C. 研究結果

2009 年にフィリピン国内 30 カ所で採集された 688 頭のネッタイシマカ幼虫の *kdr* 遺伝子頻度を表 1 に示した。また、G1016 および C1534 変異の割合を地図上に示し、過去に行ったピレスロイド剤感受性マップと比較した（図 3）。これまで中南米地域で確認されている I1011 の変異はどの個体からも検出されなかったが、V1016G の変異は 0～61% の頻度で、F1534C は 0～76.3% の頻度で確認された。G1016, C1534 ともにフィリピン全土から採集されたネッタイシマカから広範囲に確認され、特に地理的な偏りは見いだせなかった。このことは、全国的にピレスロイド系殺虫剤による淘汰が進んだために、抵抗性個体が全国的に広がっていることを示している。また、この結果は先に行ったピレスロイド剤感受性試験で、K index（薬剤感受性レベルを 1～36 でラン

ク分け、数字が大きいほど抵抗性レベルが高いことを示すインデックス) が多くの地域で最大の36を示した結果を裏付けるものとなった。

D. 考察

これまで同様の方法でベトナムのネッタイシマカについて *kdr* 遺伝子頻度が調査・報告されているが、70 地域由来の 756 頭が調べられた結果、G1016 の置換はわずか 1 地域から 20% の頻度として検出されたのみであった (Kawada et al., 2009)。これと比較すると、今回のフィリピンの結果は調査した 30 地域のうち 29 カ所から G1016 の変異が検出され、その頻度も比較的高い値を示したことから、事態はより深刻であることが分かった。また、V1016G のみでなく、F1534C を有する個体の頻度も高く、近い将来フィリピン全土において両タイプをあわせた *kdr* 遺伝子頻度が 100% に限りなく近くなる可能性も否定できない。

今回得られたデータをもとに、G1016 の頻度と C1534 の頻度の和を縦軸に、抵抗性レベルを示す K index を横軸にとりグラフを作成したところ、薬剤感受性が低いほど *kdr* 頻度も低いことが示された (図 4)。このことは、*kdr* 遺伝子頻度の調査が、ピレスロイド剤感受性調査の結果をある程度反映するものであることを示した。その一方で、抵抗性レベルが高いからといって必ずしも *kdr* 頻度が高レベルであるというわけではなく、K index が 36 を示す個体群の *kdr* 遺伝子頻度は 5.3% ~ 116.3% と大きな開きが認められた。つまり、*kdr* 因子が抵抗性の唯一の要因ではなく、他に解毒酵素や皮膚透過性の低下などの要因が抵抗性機構として関与している可能性を示した。

E. 結論

作用点ナトリウムチャネルの変異を指標としたジェノタイピング法は、野外蚊のピレスロイド剤感受性レベルをある程度反映していることが明らかになったが、*kdr* 因子以外の抵抗性機構も関与していることも示唆された。したがって、今後は、作用点変異のみならず、解毒酵素等その他の抵抗性機構を加味した簡便で迅速な薬剤感受性試験法 (ジェノタイピング法) を検討していく必要があると考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

葛西真治, 駒形修, 糸川健太郎, 小林睦生, 富田隆史 ネットアイシマカのピレスロイド剤抵抗性機構(3): マイクロアレイおよび連関解析 第 64 回日本衛生動物学会東日本支部大会, 2012 年 10 月 20, 川崎市産業振興会館ホール

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし