

論文内容の要旨

ベータノダウイルスの細胞内侵入および感染宿主域に関する検討

長崎大学大学院 医歯薬学総合研究科 新興感染症病態制御学系専攻

足立 圭

[背景と目的]

ヒトにおけるウイルス感染症は、そのほとんどが元来、ヒト以外の動物を宿主としてきたウイルスがヒトに感染し増殖できるように変異したものである。感染症に対する予防および治療法として、ウイルスの性質解析を基にワクチン、抗ウイルス剤開発が進められるが、未だ有効な薬剤開発に至っていない感染症が多い。また高病原性トリインフルエンザなど新たなウイルスの発見、感染症に対する対策が急務であると共に、更なるウイルス感染症の出現が危惧される現状である。ベータノダウイルス感染症は、養殖業における海産稚仔魚に壊滅的な被害をもたらすことから産業上大きな問題であり有効な薬剤開発が切望されているが、宿主域が魚類のみとされ積極的な研究が行われていない。しかし、そのウイルス学的性質は未だ解明されていない点が多く、ヒトを含めた哺乳動物への種を超えた感染の危険性を含むウイルスである。本研究ではウイルス学的性質の基礎的解析として、ベータノダウイルスの細胞内侵入および感染宿主域に関する検討を行った。

[実験方法]

ヒト由来細胞株に HeLa、A549 及び 293T 細胞を用い 4°C でベータノダウイルスの結合反応を行った後、RT-PCR によるウイルスゲノム RNA1 検出でウイルスの結合能を評価した。またノイラミニダーゼ処理を行った細胞に対するウイルス結合性および 28°C でウイルス感染後の経時的な細胞内でのゲノム蓄積あるいはウイルスコート蛋白質発現を検出した。精製ウイルス粒子より抽出した RNA (ウイルス RNA) を細胞に導入し、コート蛋白質発現及びウイルス産生量を TCID₅₀ 法により算出した。さらに 7 種の哺乳動物由来細胞株を用い、ウイルス感染後の経時的なコート蛋白質発現検出と培養上清のウイルスを定量した。

エンドサイトーシス阻害剤である塩化アンモニウム (NH₄Cl)、クロロキンあるいはバフィロマイシン A1 (Baf) 存在下で E-11 細胞に対しウイルス感染後、経時的な細胞状態観察と培養上清中のウイルス量を TCID₅₀ 法により算出した。1 mM NH₄Cl あるいは 1 μM クロロキン存在下でウイルス感染、ウイルス感染後での NH₄Cl 添加によるウイルスゲノム複製の有無をゲノム RNA1 検出で検討した。

[結果]

ヒト由来細胞株への結合能は魚類由来 E-11 細胞と同程度で、細胞をノイラミニダーゼ処理することでウイルスの結合が阻害された。感染 36 時間後までにゲノム RNA1 の細胞内蓄積が見られず (Fig. 1)、また感染 5 日後においてもウイルスコート蛋白質発現を検出することが出来なかった。ウイルス RNA 導入ヒト由来細胞においてコート蛋白質の発現だけでなく培養上清へのウイルス産生を検出することができた。

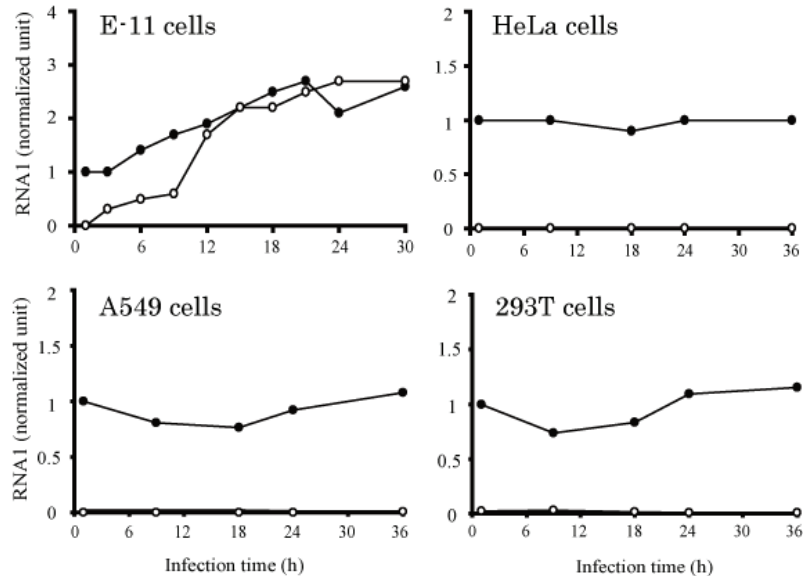


Fig. 1 感染細胞内でのプラス鎖(●)及びマイナス鎖(○)RNA1 蓄積

複数の哺乳動物由来細胞株において、ウイルス感染 1 日後でのコート蛋白質発現が検出でき、培養上清へのウイルス産生が可能であった。マウス astrocytoma 由来 DBT 細胞では E-11 細胞と同程度の 10^8 TCID₅₀/ml のウイルスが産生された (Fig. 2)。

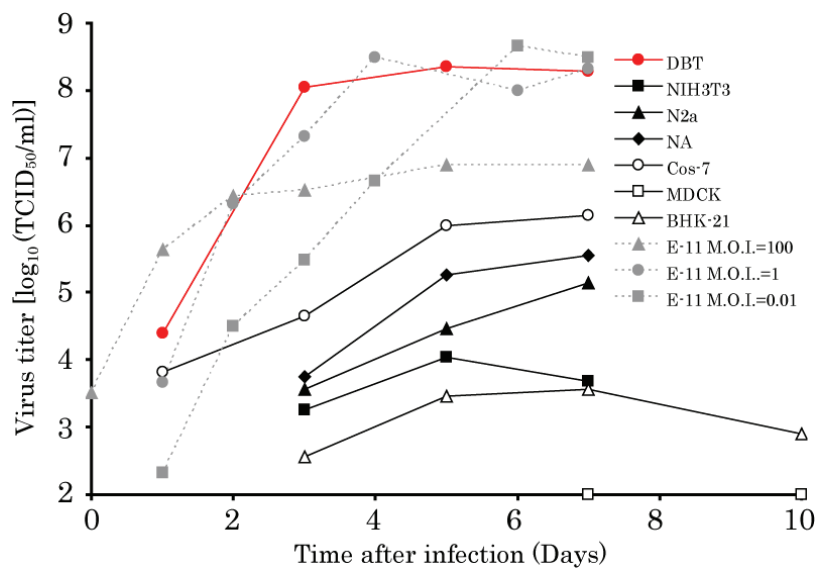


Fig. 2 哺乳動物由来細胞株におけるベータノダウイルス増殖性

1 mM NH₄Cl あるいは 1 μM クロロキン存在によりウイルス感染による細胞変性効果 (CPE) が完全に阻害された。両薬剤ともにウイルスの細胞への結合は阻害しなかったが、細胞内でのウイルスゲノム複製が生じていなかった。ウイルス感染 1 時間後

での NH_4Cl 添加ではゲノム RNA1 蓄積の部分的な阻害が見られ、3 時間後の添加では阻害を示さなかった。 NH_4Cl 、クロロキン、Baf ともに薬剤濃度依存的なウイルス産生阻害を示した (Fig. 3)。

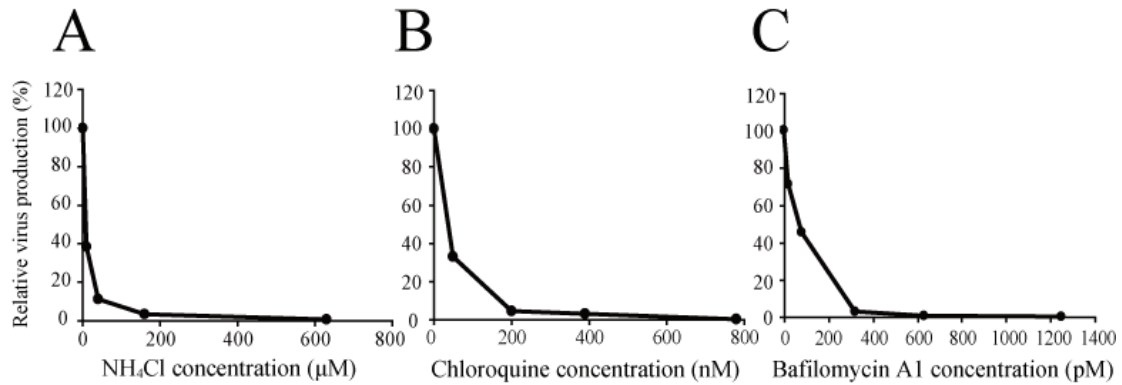


Fig. 3 塩化アンモニウム(A)、クロロキン(B)、バフィロマイシン A1(C)によるウイルス産生阻害

[考察]

ヒト由来細胞株においてもベータノダウイルスの結合は可能で、その結合にはシアル酸が関与していることが示唆された。ウイルス感染においてゲノム複製が生じず、ウイルス RNA 導入においてコート蛋白質発現およびウイルス産生が可能であったことから細胞内へのウイルス侵入が阻害されている可能性が強く、ヒト由来細胞株におけるベータノダウイルス感染に必須となる特異的レセプターの欠如が示唆された。複数の哺乳動物由来細胞株ではウイルス増殖が可能であったことからベータノダウイルスは魚類以外の種を超えた感染能を有していること、かつ DBT 細胞のように高感受性となる細胞株が魚類由来以外に存在することが分かった。DBT 細胞におけるウイルス増殖に関与する因子の探索によりベータノダウイルスの感染、増殖機構の解明に繋がると考える。

NH_4Cl 、クロロキン、Baf 処理により CPE およびウイルス産生が阻害され、 NH_4Cl はウイルスの細胞結合過程からゲノム複製に至るまでの過程を阻害したことから、ウイルスの細胞内侵入がエンドサイトーシス経路を、またクロルプロマジン存在下においても CPE を阻害出来たことからクラスリン依存性機構を介していることが示唆された。またエンドサイトーシス阻害剤の抗ベータノダウイルス剤としての応用が期待出来た。