

Salda Leonora Trinidad Demot 論文内容の要旨

主 論 文

Molecular Epidemiology of Dengue 2 Viruses in the Philippines:
Genotype Shift and Local Evolution

フィリピンにおけるデング2型ウイルスの分子疫学：遺伝子型シフトと地域進化

Leonora Trinidad Demot Salda, Maria Del Carmen Parquet, Ronald R. Matias, Filipinas
F. Natividad, Nobuyuki Kobayashi and Kouichi Morita

The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene
73 巻 4 号 pp. 796-802 2005 年

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
(主任指導教員：小林 信之)

【緒 言】

デング熱は毎年、熱帯・亜熱帯地域で五千万人以上もの患者が発生し最重要のアルボウイルス感染症の1つである。デングウイルスには4つの血清型(DENV 1, DENV 2, DENV 3, DENV 4)があり、どのデング血清型のウイルスに感染しても通常は軽症の発熱疾患(dengue fever: DF)で終わるが、時に重症のデング出血熱(dengue hemorrhagic fever: DHF)やデングショック症候群(DDS)が発症する。デングウイルスが重症の出血熱を引き起こすメカニズムは未だ十分に解明されていないが、デングウイルス株間での病原性の違いも重症化に関与する可能性が示唆されている。

デング熱・デング出血熱はフィリピンの多くの島々で流行しており4つの血清型のウイルスが流行を繰り返している。このうちデングウイルス2型(DENV 2)はほぼ10年間(1995年～2002年)常に検出されているが、同国でのDENV 2の分子疫学に関しては情報が限られている。この研究では1995年～2002年にかけてフィリピンで分離した株を用いて、現地で流行しているDENV 2の分子疫学解析を実施するとともに臨床的な重症度と遺伝子変異の関連性を検証した。

【対象と方法】

1995年から2002年の間に発生したデング熱の流行において分離したDENV 2の41株を用いた。DENV 2の確認はデングウイルス型特異的プライマーを用いたRT-PCRにより行った。ヒトスジシマカ培養細胞クローン(C6/36)細胞にウイルスを感染させ28℃で5日から7日間培養し、細胞変性を確認したのちウイルス感染培養液からウイルスRNAを抽出した。抽出したRNAを鋳型としてPrMとE蛋白質遺伝子領域(1983塩基)のcDNAをRT-PCR法で増幅したのち1.0%のagarose gel 電気泳動により精製しシーケンス反応用の鋳型として使用した。本解析で得られた配列とGen Bankで入手したDENV2の12株の配列をClustalXプログラムを用いてAlignmentを作成した。系統樹解析はPAUP4.0b10を用いてdistance matrix/neighbor joining and maximum likelihood 法

により実施した。

【結 果】

フィリピン株同士の核酸相同性は 92.0%から 100%であり、予測されたアミノ酸配列の相同性は 96.0%~100%と共に高度に保存されていた。観察されたアミノ酸変化は殆どが同類置換であった。DF からの分離株、あるいは DHF もしくは DSS からの分離株で特異的なアミノ酸変化は認められなかった。

分子疫学解析ではフィリピン株は 2 つの異なるグループ即ち、Asian 2 genotype と Cosmopolitan genotype が存在した。そのうち約 48%が Asian 2 genotype であり 52%は Cosmopolitan genotype である。Asian 2 genotype の株は 1995 年~1996 年に流行していた亜群と 1998 年~2000 年に流行した亜群に分けられるが、系統樹解析から両亜群ともに 1983 年の株(Philip 2088)から分枝した同系統のウイルスであると思われる。一方、Cosmopolitan genotype は 1998 年に初めてフィリピンで分離され 2001 年~2002 年にはフィリピンで分離された全ての DENV2 は Cosmopolitan genotype となった。フィリピンで分離された一群の Cosmopolitan genotype では E 蛋白質の 203 番目のアミノ酸がアスパラギン酸になっておりこれはオーストラリアやシンガポール、タイで分離された Cosmopolitan genotype と共通する特徴であった。

【考 察】

デングウイルス感染の重症化因子として近年ウイルス側因子の関与が示唆され患者の重症度に相関したウイルス蛋白質のアミノ酸置換や遺伝子配列が報告されている。今回比較した DENV2 の PrM-E 蛋白遺伝子質配列には、重症度と相関したアミノ酸置換等は確認されなかった。しかしながら PrM-E 部位は全ゲノムの約 1/7 であり、他の部位に重症化のマーカが存在する可能性は否定できない。

今回実施した分子疫学解析から、フィリピンでは 1980 年代から流行していた Asian 2 genotype の DENV2 が地域的に独自に進化（変化）しながら 1990 年代の後半まで流行を繰り返していたことが推測される。しかし 1998 年におそらく外部から Cosmopolitan genotype の DENV2 がフィリピンのメトロマニラに侵入し、現地の社会活動や経済活動を通して数年の歳月ののちメトロマニラからブラカン州、リーサル州、さらには北部のパンパンガ州やカビテ州、フィリピン南部のセブ島と広い範囲でフィリピン古来の Asian 2 genotype の DENV2 を駆逐してしまったと考えられる。Cosmopolitan genotype の DENV2 は現在アジアの広い範囲で流行が確認されているのである。

フィリピンにおいてCosmopolitan genotypeが急速に拡大した理由は今のところ不明である。DENV2遺伝子型間における媒介蚊に対する感受性の違い、あるいはヒトにおける感染でのウイルス血症価の差異などの可能性が考えられる。今後、この現象をさらに詳細に解析するためにフィリピン国内でもっと多くの土地からより多くのサンプルを入手し分析する必要がある。また今回の研究結果は将来起こりうるデング熱ウイルスの変異や入れ替わりによりデング感染の病態変異（重症度の変化など）を早期に発見するためには、継続的なデングウイルスの監視を遺伝子レベルで実施する必要性を示している。