

木下一美 論文内容の要旨

主 論 文

Isolation and characterization of two phenotypically distinct dengue type-2 virus isolates from the same dengue hemorrhagic fever patient

(同一デング出血熱患者から分離された性状の異なる 2 つのデングウイルス株の解析)

Hitomi Kinoshita, Edward Gitau Matumbi Mathenge, Nguyen Thanh. Hung,
Vu Thi Que Huong, Atsushi Kumatori, Fuxun Yu, Maria del Carmen Parquet,
Shingo Inoue, Ronald Roll Matias, Filipinas Florendo Natividad, Kouichi Morita,
Futoshi Hasebe

(Japanese Journal of Infectious Diseases, accepted, 2009)

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：森田 公一 教授)

【緒 言】

デング熱／デング出血熱は蚊によって媒介される最も重大なウイルス感染症である。治療薬やワクチンはなく、熱帯・亜熱帯地域での小児の罹患や死亡の最大要因の一つとなっている。デングウイルス(血清型1-4型)は *Aedes aegypti* などの蚊によって媒介され、多くは不顕性感染に終わるが、発症した場合はデング熱あるいは重症化して血漿漏出と出血傾向を示すデング出血熱／デングショック症候群を示す。近年の地球温暖化に伴い、媒介蚊と共にデングウイルスは分布域を広げ、年間 5000 万人以上がデング熱を発症し、約 50 万人がデング出血熱を発症し、その 1-5% が死亡すると世界保健機関が推計している。

デングウイルスがヒトの体内に侵入後、最初の標的細胞となるのは皮下の樹状細胞であることが知られているが、その後のウイルスの動態についてはあまり解明されていない。デングウイルス感染症の発病機序の解明及びデング患者におけるデングウイルスの主たる増殖部位を明らかにするため、フローサイトメトリーを用いて解析し、分離されたウイルスの性状解析を行った。

【対象と方法】

調査地域(ベトナムのホーチミン市)にて臨床所見よりデング熱／デング出血熱と診断された患者(80名)から採血を行い、RT-PCR 陽性19検体について蛍光標識された各種血球細胞表面抗原(CD3,CD14,CD16,CD19)抗体と抗フラビウイルス抗体による二重染色を行い、フローサイトメトリーを用いて解析するとともに、ウイルスを異なる種類の培養細胞を用いて分離しその細胞向性についての性状解析を行った。

【結 果】

- 1) デングウイルス 2 型感染のデング出血熱患者 1 例において、フローサイトメトリー解析より B 細胞 (CD19⁺) 群にウイルス抗原が認められた。B 細胞にデングウイルス抗原が検出されたデング出血熱患者血清からヒト赤芽球由来 K562 細胞および蚊由来 C6/36 細胞を用いてデングウイルス 2 型がそれぞれ (K562 細胞分離株 VnHcm18-K/02: 略称 VN18-K、C6/36 細胞分離株 VnHcm18-C/02: 略称 VN18-C) 分離された。
- 2) 2 株のウイルスの全翻訳領域の遺伝子配列 (約 11kb) を比較解析したところ、アミノ酸で 3 カ所の相違 (エンベロープ (E) 蛋白、非構造蛋白 2B (NS2B)、非構造蛋白 4B (NS4B) 領域にそれぞれ 1 カ所) が認められた。
- 3) 蚊由来細胞に対して、フォーカスアッセイと増殖曲線による性状解析を行ったところ 2 株とも感染増殖したが、VN18-C 株の方がより効率的かつ高い増殖性を示した。VN18-C を K562 細胞に感染させると、1 代の培養で VN18-K タイプのウイルスが優性となった。VN18-K を C6/36 細胞に感染させると、VN18-C タイプのウイルスの増殖が確認された。
- 4) これらのウイルスは B 細胞群にウイルス抗原が認められた患者より分離されたので、ヒト B 細胞由来 RPMI8226 細胞に対する性状を調べた。RPMI8226 細胞に対して、VN18-K 株は高い結合性を示し感染増殖したのに対し、VN18-C 株は結合性も感染性も示さなかった。
- 5) また、ウイルスが細胞に感染する際に細胞レセプターと結合するウイルス表面の E 蛋白には 62 番目のアミノ酸に 1 残基置換が認められ、RPMI8226 細胞に結合性及び感染性を示した VN18-K 株では E-62 が一般的なデングウイルスに認められるグルタミン酸からリシンに置き換わっていた。デングウイルスの E 蛋白は二量体構造をとるが、E 蛋白の立体構造解析予測により、E-62 はそのキラル軸に位置することが分かった。

【考 察】

一人の患者から異なる培養細胞を用いることにより、蚊細胞向性と B 細胞系培養細胞向性を持つ異なる性状のデングウイルスが分離されたことから、患者の血液中では少なくとも 2 つの異なるデングウイルス群が循環していたと推測された。蚊細胞で分離された蚊細胞向性のウイルス株をヒト培養細胞で 1 代培養すると、ヒト培養細胞向性なウイルスが優性になった。また逆の現象も観察された。ことから、蚊と患者の体内では優性なデングウイルス群が異なっていることが推測された。蚊の体内で増殖したデングウイルスは患者の体内に侵入後、樹状細胞や B 細胞などの細胞で感染・増殖することにより、ウイルス群の置き換え (Population switching) が起きているのではないかと考えられた。

今回観察されたデングウイルスの E 蛋白のアミノ酸の相違により、2 株の B 細胞株に対する結合性・感染性の違いが発生することが示唆された。このデングウイルスの E 蛋白上の 1 アミノ酸置換は、隣接 E 蛋白方向へ突出し電氣的に反発することにより二量体構造を弛ませ、これまでウイルス表面には露出していなかった E 蛋白の B 細胞株に対するレセプター結合部位が露出することで VN18-K 株が B 細胞株への高い結合能を示し、RPMI8226 細胞での感染増殖が可能となったものと推定された。