

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 21 日現在

機関番号：82603

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2012

課題番号：23790515

研究課題名（和文）

デングウイルス感染における抗フラビウイルス感染増強抗体の役割の解析

研究課題名（英文）

Determination of the role of anti-flavivirus antibody in antibody-dependent enhancement infection of dengue virus

研究代表者

モイメンリン (MENG LING MOI)

国立感染症研究所・ウイルス第一部・研究員

研究者番号：40597499

研究成果の概要（和文）：

本研究では、デングウイルス(DENV)による出血熱発症メカニズムを免疫学的に解析し、デング熱の重症化リスクファクターおよび出血熱の病態を解明することを目的とする。具体的には、FcγR 発現細胞を用いてフラビウイルス患者血清における抗体依存性感染増強(ADE)活性を検討した。デングウイルスおよび日本脳炎ウイルス (JEV) 患者または JEV ワクチン被接種者から経時的に採取した血清を用いて ADE 活性を検討した。DENV 患者の急性期血清においては、ADE 活性が認められた。しかし、後期の血清には中和活性が認められた。さらに、JEV 患者血清を用いて DENV と同じフラビウイルス科に属する JEV による DENV に対する免疫応答を検討した。JEV 患者血清では、DENV に対する ADE 活性が認められたが、DENV に対する交叉中和活性が認められなかった。さらに、JEV ワクチン被接種者から採取された検体を用いたところ、DENV に対する中和活性は認められなかった。以上の結果により、DENV と同じフラビウイルス科である JEV による感染および JE ワクチン接種による誘導された抗体は、DENV に対し ADE 能を有するが示唆された。しかし、DENV に対する交叉中和能が認められなかった。以上の結果により、デングウイルスと交叉反応を示す抗フラビウイルス抗体は DENV 感染において重要な役割を有することが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

In this study the role of anti-flavivirus antibodies during antibody-dependent enhancement of dengue virus (DENV) infection was characterized by using FcγR-expressing cells. Infection-enhancement antibody enhances dengue virus (DENV) replication in FcγR-expressing cells, contributing to high levels of viral replication during secondary infection; a prelude of severe DENV illness. The neutralizing and infection-enhancement activity of antibodies after dengue virus (DENV) infection, Japanese encephalitis virus (JEV) infection and JE vaccination was determined in this study. Using FcγR-expressing cells, serum samples from the early phase of DENV infection exhibited ADE activity but serum samples from late phase of DENV infection exhibited DENV neutralizing activity. Serum sample from a JEV patient exhibited ADE activity during the late phase of JEV infection. Additionally, serum samples from JEV vaccinees exhibited DENV cross-reactive IgG antibodies after JEV vaccination, but neutralizing activity to DENV was absent. The results suggest that other than DENV, flavivirus infection and vaccination also induce cross-reactive antibodies to DENV but cross-neutralizing activity may be low or absent, implying a role of these anti-flavivirus antibodies during DENV infection.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,300,000	0	2,300,000

研究分野：ウイルス学

科研費の分科・細目：感染防御・ワクチン

キーワード：感染防御・抑制、診断・治療、感染免疫

1. 研究開始当初の背景

デングウイルスは、世界的規模の流行を引き起こし、患者数は年間約3億人と推定されている。デングウイルスはフラビウイルス科に属し、4つの血清型が存在する。いずれの血清型も非致死性のデング熱および致死率の高いデング出血熱を引き起こす。非中和抗体がFcγRを介し、ウイルス感染を増強させる。この抗体依存性感染増強現象(ADE)が、重症化の一因と考えられている。このように、感染時における抗体の感染増強能および抗体の役割解析により重症化のメカニズム解明が可能となる。

日本脳炎ウイルスなどのフラビウイルスに属するウイルスに対する抗体は、デングウイルスと交叉性を有することが知られている。しかし、デングウイルス感染時における抗フラビウイルス抗体の役割は、明らかにされていない。本研究では、フラビウイルス患者およびワクチン被接種者における抗体の感染増強活性および中和活性をFcγR発現細胞により検討し、デングウイルス感染時における抗体の役割解析を行った。

2. 研究の目的

本研究課題は、新規感染増強(ADE)アッセイを用いて抗フラビウイルス抗体の感染増強活性および中和活性を検討し、デング熱の重症化リスクファクターおよび出血熱の病態解明を目的とする。

3. 研究の方法

1. ヒト血清：ヒト血清は、デング熱患者、日本脳炎患者および被ワクチン接種者から採取した。すべての検体は、ELISA法にて抗デングウイルスIgMおよびIgG抗体を検討した。

2. ウイルスと細胞培養：デングウイルス感染増強、中和試験には、DENV-1(NIID01-44株)およびDENV-2(TLC30株)を用いた。細胞は、ヒトFcγ受容体(FcγRIIA)発現BHK-21細胞およびBHK-21細胞を用いた。

3. ウイルス感染増強(ADE)試験：デングウイルスの感染増強試験は、FcγR発現BHK細胞およびBHK細胞を用いた。患者血清を10倍階段希釈し(1:10-1:100,000)、血清とウイルスを混合した。混合液を37°C、1時間反応を行った。各ウイルス-反応液をFcγR発現BHK細胞およびFcγR非発BHKに接種し、37°C、1時間吸着後、1ml培養液

(10%FBS, MEM)を加え、37°Cで5日間培養した。5日間後、細胞をホルマリンにて固定し、methylene blueにより染色を行った。

4. 中和試験：血清を2倍階段希釈し(1:10-1:1280)、血清とウイルスを混合した。混合液を37°C、1時間反応を行った。各ウイルス-反応液をFcγR発現BHK細胞およびFcγR非発BHKに接種し、37°C、1時間吸着後、1ml培養液(10%FBS, MEM)を加え、37°Cで5日間培養した。5日間後、細胞をホルマリンにて固定し、methylene blueにより染色を行った。

4. 研究成果

1. デングウイルス感染時における抗体の中和および感染増強活性

DENV-2再感染患者血清を用いて、DENV2に対する感染増強のレベルを検討した。ADEは、患者血清およびFcγR発現細胞にて検出されたが、BHK細胞では、ADEが観察されなかった。感染初期の血清では、非希釈または低希釈倍率(1:10)において、ADE活性が検出された。感染後期の血清では、中和活性のみ検出されたが、 $\geq 1:100$ 希釈倍率においてはADE活性が検出された。

2. 日本脳炎患者血清におけるデングウイルスに対する感染増強活性

日本脳炎患者から採取された血清によりFcγR発現細胞にて、DENV-2に対する感染増強活性の検討を行った。DENV-2の力価をFcγR発現細胞にて検討したところ、日本脳炎ウイルス中和抗活性を有する抗体の条件下でのDENV-2力価は抗体を加えない場合より約10倍高力価であり、DENVに対する感染増強抗体によるADEが検出された。今回の結果により、DENV以外のフラビウイルス感染(JEV)によっても、DENVに対する感染増強抗体が誘導されることが示唆された。

3. 日本脳炎抗体におけるデングウイルスに対する感染増強活性

JEVワクチン接種前および接種後の血清中にDENV抗原と交叉するIgGをELISA法にて検討した。JEVワクチン接種前の検体においては、87検体中3検体(3/87, 3%)がDENV IgG陽性であった。接種後は、7検体(7/87, 8%)が陽性だった。いずれの検体においてもDENV IgM抗体が検出されなかったことから、検体採取期間中(約3週間)にDENVに感染

されていないことを確認した。さらに、接種前と接種後の84検体においては、DENV2に対する中和活性が検出されなかった。以上の結果により、デングウイルスに対する交叉抗体は、フラビウイルス属のウイルス感染またはワクチン接種によって誘導されることが示唆された。さらに、一部の交叉抗体はDENVに対する感染増強活性を示した。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 11 件)

1. Ujiie M, Moi ML, Kobayashi T, Takeshita N, Kato Y, Takasaki T, Kanagawa S. Dengue virus type-3 infection in a traveler returning from Benin to Japan. *Journal of Travel Medicine*, 19,4, 2012, 255-257
2. Omatsu T, Moi ML, Takasaki T, Nakamura S, Katakai Y, Tajima S, Ito M, Yoshida T, Saito A, Akari H, Kurane I. Changes in hematological and serum biochemical parameters in common marmosets (*Callithrix jacchus*) after inoculation with dengue virus. *Journal of Medical Primatology*, 41,5, 2012, 289-296
3. Moi ML, Lim CK, Chua KB, Takasaki T, Kurane I. Dengue virus infection-enhancing activity in serum samples with neutralizing activity as determined by using FcγR-expressing cells. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 6(2), 2012, e1536,
4. Takasaki T, Kotaki A, Tajima S, Omatsu T, Harada F, Lim CK, Moi ML, Ito M, Ikeda M, Kurane I. Demographic features of imported dengue fever and dengue haemorrhagic fever in Japan from 2006 to 2009. *Dengue Bulletin*, 35, 2012, 217-222
5. Moi ML, 高崎智彦. 感染症迅速診断キットの有用性と限界：デング熱. *小児科*, 53(4), 2012, 457-465
6. Moi ML. クロアチアにおけるデング熱の流行. *Infectious Agents Surveillance Report*, 32 (6), 2011, 165 - 167
7. Moi ML, Takasaki T, Iwagoe H, Sakamoto M, Kobayashi K, Ujiie M. アフリカからのデング熱輸入例. *Infectious Agents Surveillance Report*, 32 (6), 2011, 164 - 165
8. Moi ML, Lim CK, Kotaki A, Takasaki T, Kurane I. Detection of higher levels of dengue viremia using FcγR-expressing BHK-21 cells than FcγR negative cells in secondary infection but not in primary infection. *Journal of Infectious Diseases*,

203(10), 2011, 1405-1414

9. Moi ML, Lim CK, Tajima S, Kotaki A, Saijo M, Takasaki T, Kurane I. Dengue virus isolation relying on antibody-dependent enhancement mechanism using FcγR-expressing BHK cells and a monoclonal antibody with infection-enhancing capacity. *Journal of Clinical Virology*. 52(3), 2011, 225-230
10. Ujiie M, Moi ML, Takeda N. Dengue maculopathy in a traveler. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 85(6), 2011, 965-966
11. Omatsu T, Moi ML, Hirayama T, Takasaki T, Nakamura S, Tajima S, Ito M, Yoshida T, Saito A, Katakai Y, Akari H, Kurane I. Common marmoset (*Callithrix jacchus*) as a primate model of dengue virus infection: development of high levels of viremia and demonstration of protective immunity. *Journal of General Virology*. 92, 2011, 2272-2280

[学会発表] (計 14 件)

1. Moi ML, Lim CK, Saijo M, Takasaki T, Kurane I. Re-assessment of dengue neutralizing antibody and viremia titers in dengue patients using FcγR-expressing cells. The 61st Annual Meeting of the American Society of Tropical Medicine and Hygiene (Atlanta, USA) November, 2012
2. Ujiie M, Moi ML, Kato Y, Kotaki A, Takeshita N, Kanagawa S, Takasaki T, Ohmagari N. Dengue fever outbreak among Japanese construction workers returning from India. The 61st Annual Meeting of the American Society of Tropical Medicine and Hygiene (Atlanta, USA) November, 2012
3. Moi ML, Omatsu T, Nakamura S, Takasaki T, Ami Y, Katakai Y, Suzaki Y, Akari H, Kurane I. Role of antibodies in dengue infection and protective immunity during secondary infection of marmosets. 第60回日本ウイルス学会学術集会 (大阪) 2012年11月
4. 小滝徹、モイメンリン、田島茂、高崎智彦. ウイルス RNA 安定保存キットの評価, 第60回日本ウイルス学会学術集会 (大阪) 2012年11月
5. 林昌宏、網康至、藤井克樹、北浦一孝、モイメンリン、白井頭治、小滝徹、須崎百合子、森川茂、西條政幸、鈴木隆二、倉根一郎、高崎智彦. マーモセットを用いたチクングンニヤウイルスの霊長類モデルの検討, 第60回日本ウイルス学会学術集会 (大阪) 2012年11月

6. **Moi ML**, Lim CK, Saijo M, Takasaki T, Kurane I. Dengue vaccine development: re-assessment fo dengue neutralizing antibody and viremia titers using FcγR-expressing cells. The 34th Naito Conference: Infection, immunity and their control for health (Hokkaido) October, 2012
7. Azami NAM, **Moi ML**, Takasaki T, Salleh SA, Neoh HM, Othman Z, Shah SA, Kurane I, Jamal R. Serological evidence of the co-circulation of multiple dengue virus serotypes in Kuala Lumpur, Malaysia. 13th Asia-Pacific Congress on Clinical Microbiology and Infection. (Beijing, China) October, 2012.
8. Ujje M, **Moi ML**, Kato Y, Kanagawa S, Ohmagari N, Takeshita N, Takasaki T. Ocular complications associated with imported dengue fever. 9th Asia Pacific Travel Health Conference in conjunction with the 5th Regional Meeting of the International Society of Travel Medicine. (Singapore) May 2012.
9. **Moi ML**, Omatsu T, Tajima S, Lim CK, Saijo M, Kurane I, Takasaki T. Application of the dengue non-structural protein 1 (NS1) ELISA for the detection of dengue virus infection in travelers. 9th Asia Pacific Travel Health Conference in conjunction with the 5th Regional Meeting of the International Society of Travel Medicine. (Singapore) May 2012.
10. **Moi ML**, Lim CK, Saijo M, Kurane I, Takasaki T. デング熱診断サーベイランスのための NS1 抗原検出診断キット. 86th Annual Meeting of the Japanese Association for Infectious Diseases (Nagasaki, Japan) April 2012.
11. Lim CK, Takasaki T, **Moi ML**, Kotaki A, Kurane I, Saijo M. Molecular diagnosis and analysis of imported Chikungunya virus strains, Japan, 2006-2010. The 60th Annual Meeting of the American Society for Tropical Medicine and Hygiene, (Philadelphia, PA) December 2011
12. **Moi ML**, Lim CK, Kotaki A, Takasaki T, Kurane I. Detection of higher levels of dengue viremia using FcγR-expressing BHK-21 cells than FcγR-negative cells in secondary infection but not in primary infection. International Congress of Virology. (北海道) 2011 年 9 月.
13. Lim CK, Ami Y, Fujii Y, **Moi ML**, Kitaura K, Kotaki A, Morikawa S, Saijo M, Suzuki R, Kurane I, Takasaki T. Pathogenesis of epidemic chikungunya virus in nonhuman

primates. International Congress of Virology. (北海道) 2011 年 9 月.

14. **Moi ML**, Lim CK, Ito M, Takasaki T, Kurane I. Antibody-dependent enhancement of dengue virus infection: revisit of antibody response and viremia in dengue patients using FcγR-expressing cells. 45th Joint Working Conference on Immunology and Viral Diseases, US-Japan Cooperative Medical Science Program. (Stanford University, カリフォルニア, 米国) 2011 年 6 月.

〔図書〕 (計 1 件)

1. **Moi ML**, 高崎智彦. 国内発生はほとんどないが注目される感染症 1—デング熱・出血熱. 小児感染症学, 2011, 508-511

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 件)

名称 :
 発明者 :
 権利者 :
 種類 :
 番号 :
 出願年月日 :
 国内外の別 :

○取得状況 (計 件)

名称 :
 発明者 :
 権利者 :
 種類 :
 番号 :
 取得年月日 :
 国内外の別 :

〔その他〕

ホームページ等

http://www0.nih.go.jp/vir1/NVL/papers_web/papers_ybv.htm

<https://sites.google.com/site/sherrymoi/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

モイメンリン (MOI MENG LING)

国立感染症研究所・ウイルス第一部・研究員
 研究者番号 : 40597499

(2) 研究分担者

()

研究者番号 :

(3) 連携研究者 ()

研究者番号：