

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2006～2008

課題番号：18406017

研究課題名（和文） デング出血熱重症化に関与するウイルス遺伝子多型性の研究

研究課題名（英文） Genetic variation of dengue virus genomes associated with severity of dengue hemorrhagic fever

研究代表者

森田 公一（MORITA KOUICHI）

長崎大学・熱帯医学研究所・教授

研究者番号：40182240

研究成果の概要：

東南アジアのデング出血熱では同じ流行、地域、同一患者体内において異なる遺伝子的背景をもつウイルスが流行・感染していることを明らかにした。さらにB細胞に感染が疑われる多数の症例を発見した。B細胞系の細胞に高い親和性を示したデング2型ウイルス株（K株）はウイルス粒子表面タンパクに特徴的な1アミノ酸変異をもっていることが明らかになった。またヒト細胞膜上に存在が知られているタンパク質のなかから、7種類のK株ウイルス受容体蛋白質候補を同定した。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	3,700,000	0	3,700,000
2007年度	4,200,000	0	4,200,000
2008年度	2,900,000	870,000	3,770,000
年度			
年度			
総計	10,800,000	870,000	11,670,000

研究分野：医歯薬学A

科研費の分科・細目：ウイルス学

キーワード：デング出血熱、熱帯性ウイルス、忘れられた病気、熱帯病

1. 研究開始当初の背景

熱帯地域におけるデング熱の流行は古くから比較的軽症で予後の良い熱性疾患の流行として知られており、17世紀にはすでにオランダ人医師によりインドでのデング熱の流行が記録されている。しかし致命率の高い重症の『デング出血熱』は1953年、フィリピンのマニラに、ついで1954年タイ国のバンコクで突如出現した新興感染症でありその後、急速に周辺のアジア諸国に拡大し現在ではアジアのみならず中南米の国々へも広

がり、熱帯全域において最重要の蚊媒介性ウイルス感染症となった。しかしデング出血熱の発生メカニズムはいまだ不明であり、デング感染症の防除や治療、ワクチン開発は困難を極めており健康被害は増大している。従来このメカニズムを説明するため幾つかの仮説が提唱されたが、おもに欧米の科学者によりデングウイルスの2次感染での免疫学的機序が支持されてきた。しかし、代表研究者らはこれまでの独自の研究成果に基づき、ウイルス側の重症化因子も重要な要因になると考えるに至った。

2. 研究の目的

そこで、本研究はデングウイルス流行地域においてデング熱、デング出血熱患者血液から得られるデングウイルス遺伝子を分子レベルで詳細に解析し、患者の重症度との関係を詳細に比較検討する一方、種々の培養細胞で分離されたウイルス株の生物学的な特徴を比較してデングウイルス感染における重症化のウイルス側要因を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

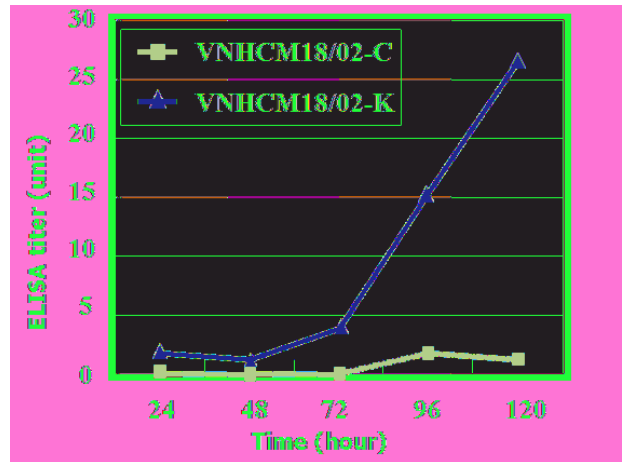
フィリピン国、ベトナム国などアジアの国々において臨床的にデング熱、デング出血熱を疑われた患者血清から、蚊培養細胞 C6/36 細胞、サル細胞 LLC-MK2 細胞、ヒト単核球系細胞 K562 細胞を用いてウイルス分離を行うとともに、RT-PCR法と RT-LAMP法によるウイルス遺伝子の検出、ELISA法を用いて抗体検査をした。また同時に患者の臨床データをデータベースに入力した。分離したウイルスは長崎大学熱帯医学研究所に保存するとともにそれぞれのウイルス株について、ウイルス遺伝子の全塩基配列をシーケンスして決定し、分子疫学的解析した。さらに、フィリピン国マニラ市のセントルークメディカルセンターおよびベトナム国ホーチミン市において PCR法によりデングウイルスが陽性であった患者の抹消血サンプルについてフローサイトメトリーで解析しデング感染細胞を検出し、種々の細胞マーカーについての反応性を検討した。また同時に分離したウイルスの種々のヒト単核球系の培養細胞や蚊由来細胞を用いてウイルスの性状を比較解析した。さらにバングラデシュ、ミャンマー、ネパールなどの他の東南アジアの国々でもデングウイルスの分離を実施してウイルスの比較を実施し分離株を保存解析した。

4. 研究成果

(1) B細胞感染性デング2型ウイルスの分離

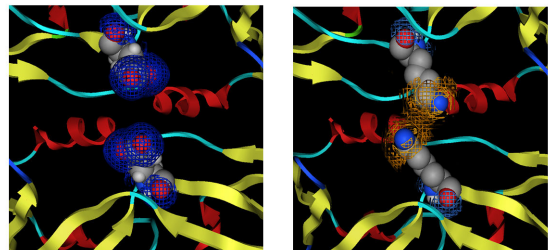
ベトナムにおいては同一患者からB細胞系細胞に高い感受性を持つデング2型ウイルス(K株)と持たない2型ウイルスの2系統のウイルスが同一患者に感染している事を発見した(図1)。この2つの2型ウイルスの遺伝子の変異は少なく、とくにウイルス表面蛋白質Eには一か所のアミノ酸変異がみられるのみであり、このアミノ酸の変異によりヒト細胞への吸着性が変化することを突き止めた(図2)。現在K株が認識しているヒト細胞表面の分子を同定しており、重症化との関連を明らかにしてゆく必要がある。

(図1) K562細胞でのK株の高増殖性



(図2) 62E-K変異による立体構造の変化

FH18-C 62E Glutamic Acid FH18-K 62K Lysine



(2) フィリピンにおけるデング3型ウイルス感染患者におけるB細胞感染症例

またフィリピンにおいてはデングウイルス感染が疑われる患者75名のうち7名の患者がRT-PCR法によってデング3型ウイルス陽性を示した(表1)。このうち5名の患者血液でCD19陽性細胞(B細胞)にデングウイルス抗原が認められ、1名の患者ではCD16陽性細胞(NK細胞)、残りの1名の患者ではCD19陽性細胞とCD16陽性細胞の両方の細胞群にデングウイルス抗原が認められた。これらの患者から分離したウイルスは蚊細胞ではよく増殖したが、ヒト単核球系細胞(K562細胞等)ではあまり増殖しかなかった。しかし、特殊な条件下(論文準備中)ではK562細胞に容易に持続感染することを発見した。現在、この持続感染と病原性との関連を検討している。

(表1) フィリピンにおけるB細胞感染例

Patient Code	Age/Sex	RT-PCR	DV Ag (+) cell group	IgM+ ELISA P/N ratio	Virus Isolation
06RBD 411	15 / M	D3 (+)	CD19	1.820 (-)	-
06RBD 412	17 / F	D3 (+)	CD19	0.672 (-)	D3 (+)
06RBD 500	11 / F	D3 (+)	CD16/CD19	0.702 (-)	D3 (+)
06RBD 501	14 / M	D3 (+)	CD19	0.771 (-)	D3 (+)
06RBD 502	27 / M	D3 (+)	CD16	4.680 (+)	-
06RBD 533	16 / M	D3 (+)	CD19	0.967 (-)	D3 (+)
06RBD 534	41 / M	D3 (+)	CD19	0.900 (-)	D3 (+)

* P/N ratio 2.0 ≤ +, ** Using C6/36 and K562 cells

いずれにしても、ベトナムのデング2型ウイルス感染、およびフィリピンのデング3型ウイルス感染のいずれでも、感染者のある程度の集団には末梢血中のB細胞にウイルス抗原が存在することが証明された。これらの研究からデングウイルスの遺伝子多型成がより詳細にあきらかになり、またそれが標的細胞の多様性へとつながりひいては病原性を左右する因子になるという我々の仮説を示す一根拠となると考えている。今後、分離したウイルスを用いて病原性に関与する血管透過因子の刺激能を検証する必要がある。

(3)分子疫学解析

同時に実施した、周辺国のデング調査においてはネパールで初めてデング熱が流行していることをウイルス学的に証明する一方で、マニャンマーやバングラデシュにおいてデングウイルスを分離して分子疫学解析を実施して、この地域のデングウイルスが移動している状況を明らかにした。(成果文献参照)

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 17件)

- 1) Le Roux CA, Kubo T, Grobbelaar AA, van Vuren PJ, Weyer J, Nel LH, Swanepoel R, Morita K, Paweska JT. Development and evaluation of a real-time reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification assay for rapid detection of Rift Valley fever virus in clinical specimens. *J Clin Microbiol.* 47(3):645-51. 2009 (査読有)
- 2) 森田公一; 蚊媒介性の熱帯性ウイルス疾患—デング出血熱の発症機序をめぐって—; 最新医学 (The Medical Frontline), Vol 64(4), 919-923, 2009. (査読無)
- 3) 森田公一、木下一美; デング熱研究の最前線; 医学のあゆみ (J. Clin. Exp. Med.) Vol. 229(4), 241-245, 2009 (査読無)
- 4) Nguyen Thi Phuong Lan, Mihoko Kikuchi, Vu Thi Que Huong, Do Quang Ha, Tran Thi Thuy, Vo Dinh Tham, Ha Manh Tuan, Vo Van Tuong, Cao Thi Phi Nga, Tran Van Dat, Toshifumi Oyama, Kouichi Morita, Michio Yasunami, Kenji Hirayama. Protective and Enhancing HLA Alleles, HLA-DRB1*0901 and HLA-A*24, for Severe Forms of Dengue Virus Infection, Dengue Hemorrhagic Fever and Dengue Shock Syndrome. *PLoS Neglected Tropical Diseases.* Vol. 2. e304, 2008 (査読有)
- 5) Kazuya Hidari, Naonori Takahashi, Masataka Arihara, Masato Nagaoka, Kouichi Morita, Takashi Suzuki. Structure and anti-dengue virus activity of sulfated polysaccharide from a marine alga, *Biochemical and Biophysical Research Communications* Vol. 376, 91-95: 2008 (査読有)
- 6) Manmohan Paridal, Santhosh Sannarangaiah, Paban Kumar Dash, P. V. L. Rao and Kouichi Morita: Loop mediated isothermal amplification (LAMP): a new generation of innovative gene amplification technique; perspectives in clinical diagnosis of infectious diseases. *Reviews in Medical Virology* Vol. 18: 407-422:2008 (査読有)
- 7) Takeshi Nabeshima, Phan Thi Nga, Posadas Guillermo, Maria del Carmen Parquet, Fuxun Yu, Nguyen Thanh Thuy, Bui Minh Trang, Nguyen Tran Hien, Vu Sinh Nam, Shingo Inoue, Futoshi Hasebe, and Kouichi Morita. Isolation and Molecular Characterization of Banna Virus from Mosquitoes, Vietnam. *Emerging Infectious Diseases* Vol. 14(8), 1276-1279; 2008 (査読有)
- 8) Basu Dev Pandey, Kouichi Morita, Santa Raj Khanal, Tomohiko Takasaki, Isao Miyazaki, Tetsuro Ogawa, Shingo Inoue, Ichiro Kurane. Dengue virus, Nepal. *Emerging Infectious Diseases* Vol. 14(3), 514-515; 2008 (査読有)
- 9) 森田公一: 「デング熱・出血熱」、臨床と研究:85(9), 1242-1246, 2008 (査読無)
- 10) 森田公一: 「デング出血熱ワクチン」。日本臨床, Vol66(10), 1999-2003, 2008 (査読無)
- 11) Ito M, Yamada K, Takasaki T, Pandey B, Nerome R, Tajima S, Morita K, Kurane I. Phylogenetic analysis of dengue viruses isolated from imported dengue patients: possible aid for determining the countries where infections occurred. *J Travel Med.* Vol. 14(4):233-44. 2007 (査読有)
- 12) Parida, M. M., Santhosh, S. R., Dash, P. K., Tripathi, N. K., Lakshmi, V., Mamidi, Ambuj, N., Gupta, N., Saxena, P., Pradeep Babu, J., Lakshmana Rao P. V., and Morita, K. Rapid and Real-time detection of Chikungunya virus by Reverse Transcription Loop Mediated Isothermal Amplification (RT-LAMP) Assay. *J. Clin. Microbiol.* Vol. 45:351-357, February 2007 (査読有)

- 13) Islam M. A., Ahmed M. U., Begum N., Chowdhury N. A., Khan A. F., Parquet M. C., Bipolo S., Inoue S., Hasebe F., Suzuki Y., Morita K. Molecular Characterization and Clinical Evaluation of Dengue Outbreak in 2002 in Bangladesh. Japanese Journal of Infectious Diseases, Vol. 59, 85-91, 2006. (査読有)
- 14) Aoki, C., Hidari, K. I. P. J., Itonori, S., Yamada, A., Takahashi, N., Kasama, T., Hasebe, F., Islam, M. A., Hatano, K., Matsuoka, K., Taki, T., Guo, C.-T., Takahashi, T., Sakano, Y., Suzuki, T., Miyamoto, D., Sugita, M., Terunuma, D., Morita, K., and Suzuki, Y.: Identification and Characterization of Carbohydrate Molecules in Mammalian Cells Recognized by Dengue Virus Type 2. Journal of Biochemistry, Vol. 139, 607-614, 2006 (査読有)
- 15) Parida, M. M., Santhosh, S. R., Dash, P. K., Tripathi, Saxena, N. K., Ambuj, P. S., Sahni, A. K., Rao, P. V. Lakshmana, and Morita, K. Development and Evaluation of Reverse Transcription-Loop-Mediated Isothermal Amplification Assay for Rapid and Real-Time Detection of Japanese Encephalitis Virus. J. Clin. Microbiol. Vol. 44: 4172-4178, November 2006 (査読有)
- 16) Kazunori Oishi, Cynthia A. Mapua, Celia C. Carlos, Maria T. D. D. Cinco-Abanes, Mariko Saito, Shingo Inoue, Kouichi Morita and Filipinas F. Natividad: Dengue and other Febrile Illnesses among Children in the Philippines. Dengue Bulletin - volume 30: 26-34, 2006. (査読有)
- 17) 長谷部太、森田公一:「デングウイルス研究の最前線」、医学のあゆみ Vol 2218, 845-848, 2006. (査読無)

[学会発表] (計 24 件)

- 1) 木下一美、Huong Vu Thi Que, Hung Nguyen Thanh, Michael Baclig O, Corazon Buerano C, Ronald Matias R, Filipinas Natividad F, 井上真吾、森田公一、長谷部太: デング患者の抹消血中におけるウイルス準種(viral quasispecies)と細胞向性. 第56回日本ウイルス学会学術集会・岡山県岡山市、2008年10月26-28日
- 2) 左一八、森田公一、鈴木隆: フラビウイルス-硫酸化糖鎖分子間相互作用の解析. 第56回日本ウイルス学会学術集会・岡山県岡山市、2008年10月26-28日
- 3) 保亨、井上真吾、鍋島武、森田公一: デングウイルスの4血清型の全てを同時に検出可能なデングウイルス共通RT-LAMP法の確立. 第56回日本ウイルス学会学術集会・岡山県岡山市、2008年10月26-28日
- 4) NGWE TUN MYA MYAT, Kyaw Zin Thant, Parquet Maria del C., 井上真吾, Yee Yee Lwin, Pe Thet Khin, Tin Myint, Khin Htwe, 鍋島武、森田公一: ミャンマー北部におけるデングウイルス感染症の分子疫学のおよび血清学的調査. 第49回日本熱帯医学会大会・東京都国立国際医療センター、2008年10月25-26日
- 5) Kyaw-Zin Thant, Mya M. Ngwe-Tun, Yee-Yee Lwin, Sanda Lin, Kay-Thi Aye, Pe-Thet Khin, Tin Myint, Khin Htwe, Takeshi Nabeshima, Shingo Inoue, Maria D.C. Parquet and Kouichi Morita: MOLECULAR EPIDEMIOLOGY OF DENGUE VIRUSES CO-CIRCULATING IN UPPER MYANMAR IN THE YEAR 2006. The Second International Conference on Dengue and Dengue Haemorrhagic Fever - Global Innovation to Fight Dengue. Phuket, Thailand, 2008年10月15-17日. (Poster Presentation)
- 6) Kinoshita H, V. T. Q. Huong, E. G. Mathenge, N. T. Hung, A. Kumatori, S. Inoue, K. Morita and F. Hasebe: CELL TROPISM OF DENGUE VIRUSES: POSSIBLE VIRUS POPULATION SWITCHING BETWEEN PATIENT AND MOSQUITO. The Second International Conference on Dengue and Dengue Haemorrhagic Fever - Global Innovation to Fight Dengue. Phuket, Thailand, 2008年10月15-17日. (Oral Presentation)
- 7) Basu Pandey, Ramesh Pun, Om Shah, Krishina Pant, Kouichi Morita, Shingo Inoue, Yae Kurosawa and Ichiro Kurane: EMERGENCE OF DENGUE VIRUS IN TARIA REGION OF NEPAL. The Second International Conference on Dengue and Dengue Haemorrhagic Fever - Global Innovation to Fight Dengue. Phuket, Thailand, 2008年10月15-17日. (Poster Presentation)
- 8) Morita K. Isolation and Characterization of B-cell tropic dengue virus type 2 from a dengue hemorrhagic fever patient. The 3rd Nagasaki Symposium on Tropical and Emerging Infectious Diseases, Nagasaki Japan. 10-11 October, 2008.

- 9) Morita K Isolation and Characterization of B-cell tropic dengue virus from a dengue hemorrhagic fever patient in Vietnam: 1st Philippine International Dengue Symposium, Quezon City, Philippines, 27 September, 2008.
- 10) Morita K.; Arbovirus situation in Vietnam. Third AREVA-Pasteur Forum, "Mosquito and tick-borne viruses and their environment", Shanghai, China June 12-14, 2008
- 11) 左一八、在原雅貴、杉浦信夫、木全弘治、鈴木康夫、森田公一、鈴木隆：硫酸化糖鎖分子に対するフラビウイルス結合性の解析：第43回日本脳炎ウイルス生態学研究会・香川県観音寺市（琴弾荘）、2008年5月30日-31日
- 12) 長谷部太、木下一美、VuThiQueHuong、Michael O. Baclig、Ronald R. Matias、Filipinas F. Natividad、井上真吾、森田公一：第43回日本脳炎ウイルス生態学研究会・香川県観音寺市（琴弾荘）、2008年5月30日-31日
- 13) 久保亨、森田公一：Rift Valley fever ウイルスに対する LAMP 法の確立。第55回日本ウイルス学会学術集会・北海道札幌市、2007年10月21-23日
- 14) 鍋島武、Parquet Maria del Carmen、余福勲、Posadas Guillermo、井上真吾、長谷部太、森田公一：ベトナム北部の蚊からの Banna virus 近縁ウイルスの分離。第55回日本ウイルス学会学術集会・北海道札幌市、2007年10月21-23日
- 15) 加藤大介、左一八、長谷部太、森田公一、鈴木康夫、鈴木隆：フラビウイルス結合性糖鎖分子の構造と機能。第55回日本ウイルス学会学術集会・北海道札幌市、2007年10月21-23日
- 16) 長谷部太：フローサイトメトリーによる Dengue ウイルス患者血液の解析。第14回トガ・フラビ・ペスチウイルス研究会 札幌市 2007年10月20日
- 17) 久保亨、森田公一、PAWESKA JANUSZ, LE ROUX CHANTEL：Rift Valley fever ウイルスに対する LAMP 法の確立。第48回日本熱帯医学会大会・大分県別府市、2007年10月12-13日
- 18) 齋藤麻理子、本田章子、井上真吾、有吉紅也、大石和徳：Dengue ウイルス二次感染症におけるマクロファージによる血小板貪食クリアランスの亢進：第48回日本熱帯医学会大会・大分県別府市、2007年10月12-13日
- 19) 木下一美、BACLIG MICHAEL O. GERVACIO LEONORA T. S. MATIAS RONALD R., NATIVIDAD FILIPINAS F. NGUYEN THANH HUNG, VU THI QUE HUONG、井上真吾、森田公一、長谷部太：フローサイトメトリーを用いた Dengue 患者血液の解析。第48回日本熱帯医学会大会・大分県別府市、2007年10月12-13日
- 20) 長谷部太、Michael O. Baclig, Leonara T.S. Gervacio, Corazon C. Buerano, Ronald R Matias, Filipinas F. Natividad, Nguyen Thanh Hung, Tran Khiem Hung, Vu Thi Que Huong, 木下一美、井上真吾、森田公一：Dengue 患者血液における Dengue ウイルスの標的細胞。第44回日本ウイルス学会九州支部総会・長崎県長崎市、2007年10月12-13日
- 21) Morita K. Studies on anti-dengue compounds that inhibit cell entry. International Symposium on Dengue. (Pune, India, November 10, 2006)
- 22) 左一八、森田公一、長谷部太、鈴木康夫、鈴木隆：ウイルス結合性糖鎖誘導体を用いた Dengue ウイルス感染阻害作用の検討。第54回日本ウイルス学会学術集会・愛知県名古屋市、2006年11月19-21日
- 23) 井上真吾、長谷部太、森田公一：Dengue ウイルス感染症における一次感染および二次感染診断法の開発。第54回日本ウイルス学会学術集会・愛知県名古屋市、2006年11月19-21日
- 24) Hidari K., Aoki C., Yamada A., Hasebe F., Islam MA., Hatano K., Matsuoka K., Guo CT., Takahashi T., Sakano Y., Suzuki T., Miyamoto D., Terumura D., Morita K., Suzuki Y. Identification and characterization of carbohydrate determinant that is recognized with domain III of dengue virus envelope glycoprotein. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress. (Kyoto, Japan. June 18-23, 2006)

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）
該当なし

○取得状況（計 0 件）
該当なし

（その他）

ホームページ

<http://www.tm.nagasaki-u.ac.jp/virology>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

森田 公一 (KOUICHI MORITA)
長崎大学・熱帯医学研究所・教授
研究者番号：40182240

(2) 研究分担者

長谷部 太 (FUTOSHI HASEBE)
長崎大学・国際連携研究戦略本部・教授
研究者番号：20253639

井上 真吾 (SHINGO INOUE)
長崎大学・熱帯医学研究所・助教
研究者番号：00346925

(3) 連携研究者

Vu Thi Que Huong,
ホーチミン市パスツール研究所・部長
Mai Q Le
ベトナム衛生疫学研究所・部長
Filipinas Natividad
セントルークス医療センター・教授