

氏名(国籍)	ベティ エルナワティ デヴィ (インドネシア)		
学位の種類	博士(医学)		
学位記番号	博甲第3824号		
学位授与年月日	平成17年3月25日		
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当		
審査研究科	人間総合科学研究科		
学位論文題目	Immunological and Virological Analysis of the Pathogenesis of Dengue Hemorrhagic Fever (デング出血熱の病態形成機序に関する免疫学的及びウイルス学的研究)		
主査	筑波大学教授	理学博士	太田敏子
副査	筑波大学客員教授 (国際医療センター研究所)	医学博士	石坂幸人
副査	筑波大学教授	医学博士	二宮治彦
副査	筑波大学助教授	博士(理学)	清水健

論文の内容の要旨

【目的】

デング出血熱の病態機序の解明は、デングウイルス研究の最も重要な課題のひとつである。デング出血熱の病態形成機序に関わる要因を明らかにすることを目的として研究を行い、以下の結果を得た。1) 血管透過性亢進測定のため、血管内皮細胞を用いた *in vitro* 実験系を確立した。2) 末梢血リンパ球による血漿漏出亢進の機序を明らかにした。3) デング出血熱患者において血管内皮細胞が活性化されていることを明らかにした。さらに、4) デング出血熱患者から分離されたウイルス株は特徴的な遺伝子変異を有し、ヒト単球に強い感染性を有していることを明らかにした。

【対象と方法】

1) ヒト血管上皮細胞の透過性を、細胞の電気抵抗により測定する装置を作成した。これは電気抵抗が下がると、アルブミンの透過量が増加するように連動している装置である。サイトカインとデングウイルス感染がヒト臍帯血管内皮細胞の透過性に与える影響を抵抗値 (TEER 値) によって測定した。2) 白血球、ウイルス、透過性亢進上皮細胞との相互作用について、1) のアッセイ系を用いて細胞の電気抵抗値とアルブミンの透過量を測定した。3) 生体内における病態を明らかにするため、ELISA 法により DHF 患者血清中の各種サイトカインと活性化物質のレベルを調べた。4) DHF 患者から分離された株とデング熱 (DF) 患者より分離された株のデング 3 型ウイルスについて、ヒト単球細胞における増殖能および塩基配列の比較を行った。

【結果】

1) ヒト血管上皮細胞の電気抵抗値を測定するアッセイ系が確立し、それを用いて、細胞を調べたところ、電気抵抗値の減少は、アルブミン透過性亢進と相関し、TNF- α と IFN- γ は電気抵抗値を低下させた。また、デング熱ウイルスの moi を 5pfu/cell まで上げて感染させると電気抵抗が減少した。低い moi では変化はな

いが、これに TNF α を加えると電気抵抗値が減少した。このように、TNF- α とデングウイルス感染は、血管内皮細胞の透過性 TEER 値を相乗的に減少させた。

2) デングウイルス感染血管内皮細胞に末梢血リンパ球を加えることにより TEER 値の減少、アルブミン透過性の亢進、及び血管内皮細胞の形態学的変化が認められた。また VE-カドヘリンの mRNA 転写レベルや蛋白質レベルの発現量も低下した。

3) 一方、患者血清中のサイトカイン量を調べると、デング出血熱患者においては血管内皮細胞活性化物質が高値を示し、血管内皮細胞が高度に活性化していることが示唆された。デング出血熱患者では sTNF-R1 レベルが高く、健常人では検出されない TNF- α も検出された。

4) DHF 患者由来の 3 型デングウイルスには、蛋白質のコード枠内外に 40 カ所もユニークな塩基置換が見られた。うち 24 箇所は DHF 株間で保存されており、DF 株とは異なっていた。しかも DHF 株はヒト単球細胞株において、DF 株よりも高い増殖能を示した。

【考察】

これらの結果から、TNF- α とデングウイルス感染は、血管内皮細胞の透過性 TEER 値を相乗的に減少させること、末梢血リンパ球はデングウイルス感染血管内皮細胞の透過性を亢進し、その透過性の亢進には VE-カドヘリンの抑制が関与していること、TNF- α のデング出血熱の病態形成へ関与していること、DHF 株は特徴的な遺伝子変異を有し、これがヒト単核球に強い感染性を示す可能性を示唆した。

以上の結果は、ヒト免疫反応とデングウイルス両者が血管内皮細胞の透過性亢進に関与していることを示している。

審 査 の 結 果 の 要 旨

本研究は、デング出血熱の病態形成機序に関わる要因を明らかにすることを目的として調べたものである。血管透過性亢進測定のため、血管内皮細胞を用いた *in vitro* 実験系を確立したことと、これにより末梢血リンパ球による血漿漏出亢進の機序を明らかにしたことは、デング出血熱の治療に多大な貢献をするため、臨床的にも高く評価できる。また、その分子メカニズムには迫っていないが、着眼点は的を得ており今後の展開が期待される。また、デング出血熱の病態機序の解明は、アジア途上国における最も重要な課題のひとつであるが、これには途上国との研究連携が必要である。研究拠点づくりのためにも、途上国の人材養成のためにも本人の努力を高く評価したい。

よって、著者は博士（医学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。