ウイルス性血小板減少：デングウイルス を使用した *in vitro* 実験

船原 芳範* 藤田 宣哉** 奥野 良信*** 小川 公二*
平田 まり* 三木美智子* 北口 博教*

Virus induced thrombocytopenia : *in vitro* studies on the dengue virus-platelet interaction

Yoshinori FUNAHARA*, Nobuya FUJITA**, Yoshinobu Okuno***,
Kohji OGAWA*, Mari HIRATA, Michiko MIKI*
and Hiromichi KITAGUCHI*

Key words: thrombocytopenia, dengue virus, anti-dengue
virus antibody, endothelial cell

Changes of platelet counts by dengue virus (DV)-platelet interaction were studied *in vitro* with the aim to investigate a mechanism of how virus causes prominent thrombocytopenia characteristically seen in some virus disease, such as dengue hemorrhagic fever. The results obtained showed (1) that human platelets bound DV-antigen without immune-mediated reaction, (2) that decrease of platelet counts was more markedly demonstrated by the binding of anti-DV antibody on the DV-antigen associated with platelets than by the binding of DV-antigen-anti-DV-antibody complex on the platelets, and (3) that an interaction of platelet with DV-infected endothelial cell induced the decrease of platelet counts.

はじめに

ウイルス性血小板減少におけるウイルスの役

割の一端を解明する目的で、著しい血小板減少
を伴うデング出血熱 (DHF)¹⁾ の病因ウイルス
(デングウイルス DV)²⁾ を使用して *in vitro* で

* 神戸大学医学部第一生理 [〒650 神戸市中央区楠町 7丁目], First Department of Physiology, Kobe University School of Medicine, Kobe Japan.

** 神戸大学医学部微生物, Department of Microbiology, Kobe University School of Medicine, Kobe, Japan.

*** 大阪大学微生物研防疫, Research Institute for Microbial Disease, Osaka University, Osaka, Japan.

Fig. 1 Changes of platelet count after dengue virus-platelet interaction.

- (A) 400 μ l of PBS containing DV, 50 μ l of human PRP and 50 μ l of rabbit serum were mixed and stirred at 37°C in an aggregometer.
- (B) 50 μ l of human PRP was added to the DV-antigen · anti DV-antibody complex formed by mixing 400 μ l of PBS containing DV and 50 μ l of anti-DV rabbit serum at 37°C for 7 min in an aggregometer.
- (C) After 400 μ l of PBS containing DV and 50 μ l of human PRP were mixed and stirred for 2 min at 37°C in an aggregometer, 50 μ l of anti-DV rabbit serum was added.

の実験を行った。

DHF の血小板減少は DV による骨髓巨核球の傷害³⁾、循環血中の DV · 抗 DV 抗体複合体による血小板傷害^{4,5)}等に起因することが示唆されている。しかし、インフルエンザウイルスは血小板と結合し、血小板傷害を介し血小板減少を惹起させる^{6,7,8)}ため、DV にもインフルエンザウイルス様の活性が存在するか否かにつき検討した。また、DV が培養血管内皮細胞に感染し、増殖する⁹⁾ため、DV が血管内皮細胞感染を介して血小板減少を惹起させる可能性についても検討した。

I. 材料および方法

DVI 型(ハワイ株)または DV 2 型 (NGC 株) を *Aedes albopictus* (C6/36) 細胞に感染させ、

Fig. 2 Replication of dengue virus in cultured endothelial cells from human umbilical vein.

1 ml of culture medium containing DV (10^6 pfu/ml) was applied to cultured endothelial cells (confluent in Falcon 3008 plate). After 1 hr-incubation at 37°C, change of the medium with fresh culture medium not containing DV was followed, then DV titer in the medium was assayed at the time indicated.

培養液上清を超遠心で精製した DV を使用した。抗 DV 抗体は DV 免疫家兎血清を、DV 抗原の検出は FITC 蛍光抗体法および PAP 法¹⁰⁾を使用した。DV 価の測定は Fujita らの方法に従った¹¹⁾。反応液中の遊離血小板残存率は Coulter Counter を使用して求めた¹²⁾。ヒト臍帯静脈内皮細胞培養は Jaffe の方法に従った¹³⁾。PBS は Ca^{++} free, pH 7.4 を使用した。

II. 結 果

1. DV · 血小板反応による血小板減少

DV 浮遊 PBS (4.3×10^8 PFU/ml) 400 μ l に新鮮ヒト PRP 50 μ l を添加し、37°C で aggregometer 中で混合し、遊離血小板残存率を経時的に測定した。その結果は図 1 A に示されているごとく、残存率の変動を認めなかった。しかし、2%牛血清アルブミン添加 PBS で十分に洗滌した血小板には DV 抗原が検出された。そ

Fig. 3 Changes of platelet count after incubation of human platelet with cultured endothelial cell from human umbilical vein.

- (A) 1 ml of PRP (20 times diluted with PBS containing 2% bovine serum albumin) was incubated with endothelial cells (confluent in Falcon 3008 plate) in a shaking water bath at 37°C.
- (B) 1 ml of the PRP was incubated with DV infected endothelial cells (4th day after the infection) in a shaking water bath.
- (C) 1 ml of the PRP in the plate was incubated with 4 μ M ADP (final conc.) in a shaking water bath.

れゆえ、上記の操作に従い DV 抗原を結合させた血小板に抗 DV 抗体 50 μ l を添加し、残存率を測定した。その結果は図 1 C に示されているごとく、添加 1 分後に 90% に減少し、2 分後では 95% と上昇したが、3 分後には再度減少し始め 4 分後に 70% になった。一方 DV 浮遊 PBS 400 μ l と抗 DV 抗体 50 μ l をあらかじめ反応させ DV・抗 DV 抗体複合体を作成後、PRP 50 μ l を添加し、残存率を測定すれば、図 1 B に示されるごとく、1～2 分後に一過性に 90% に減少したにすぎなかった。

2. DV 感染血管内皮細胞・血小板反応による血小板減少

培養血管内皮細胞（2 代目、抗第 VIII 因子抗体で染色し内皮細胞由来であることを確認）に DV 10⁶PFU/ml を接種し、1 時間後に培養液を交換し、遊離 DV を除去し、その後培養液中の DV 価を経時的に測定した。その結果、図

2 に示されているごとく、DV 価は 48 時間まで急激に上昇し、72～96 時間後にほぼ最高値に達した。一方、培養血管内皮細胞には DV 抗原が検出された。それゆえ、DV 感染 96 時間目の血管内皮細胞 (Falcon multiwell tissue culture plate 3008 に confluent) に PRP 1 ml (2% 牛血清アルブミン添加 PBS で 20 倍に希釈した PRP) を添加し、振盪恒温槽 (37°C) 中で孵置し、残存率を経時的に測定した。その結果は図 3 B に示されているごとく、一過性に減少し、10 分後に最低値 80% になった。一方、非感染内皮細胞使用時には残存率に変化を認めなかった (図 3 A)。この実験系では PRP に終濃度 4 μ M ADP 添加時、図 3 B とほぼ同様の变化を示す (図 3 C)。

III. 考 察

DV 抗原は抗体の関与なしに血小板と結合することが今回の研究で示されたが、この結合のみでは血小板減少は認められなかった。この結果は、DHF の血小板減少は DV の血小板への直接作用の結果でないことを示しており、DV はインフルエンザウイルス^{6,7,8)}と異った機作で血小板減少を惹起させることを示唆している。DHF が DV の二次感染時に高率に発生する^{4,5)}ことから、血小板減少に抗 DV 抗体の関与が考えられたため、抗 DV 抗体の存在下で DV が効果的に血小板減少を惹起させる条件につき検討し、DV 抗原結合血小板と抗 DV 抗体の反応が効果的に血小板減少を惹起させることが明らかとなった。この結果は、血小板上での DV 抗原と抗 DV 抗体反応が血小板減少を惹起させる点で、従来、DHF において示唆されていた循環血中の DV・抗 DV 抗体複合体による血小板減少^{4,5)}とは異なるものであり、従来の機作に比べより効果的に血小板減少を惹起させる点において DHF の血小板減少の発生を説明する有力な機作であると思われる。

また、DV 感染血管内皮細胞と血小板反応も血小板減少を惹起させることが示されたため、DV の血管内皮細胞感染は血小板減少を亢進させると同時に、血管傷害を起し、DHF の出血性素因の 1 因を作っているとみなされる。

以上の結果より、DV 感染においては血中の抗 DV 抗体価の上昇と DV 抗原結合血小板の存在時期の一致時に急激な血小板減少が生じ、DV の血管内皮細胞感染は減少を亢進させるものとみなされた。

文 献

- 1) Funahara, Y., Sumarmo and Wirawan, R.: Features of DIC in dengue haemorrhagic fever. Proceedings of International symposium on DIC. (Tokyo Univ. Press in press).
- 2) WHO: Guide for diagnosis, treatment, and control of dengue haemorrhagic fever. (2nd ed.), 1980.
- 3) Nelson, E.R. and Bierman., H.R.: Dengue fever: A thrombocytopenic disease? J. Am. Med. Ass., **190**; 99~103, 1964.
- 4) Halstead, S.B.: Observations related to pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. VI. Hypothesis and discussion. Yale J. Biol. Med., **42**; 350~362, 1970.
- 5) Russel, P.K.: Immunopathologic mechanisms in the dengue shock syndrome. In Progress in Immunology (ed. Amos.B.) pp.831~838 (Academic Press. N.Y., 1971).
- 6) Motulsky, A.G.: Platelet agglutination by influenza virus. Clin. Res. Proc., **1**; 100, 1953.
- 7) Lu, W.C.: Agglutination of human platelets by influenza (PR-8 strain) virus and mumps virus. Fed. Proc., **17**; 466, 1958.
- 8) Terada, H., Baldini, M., Ebbe, S. and Madoff, M.A.: Interaction of influenza virus with blood platelets. Blood, **28**; 213~228, 1966.
- 9) Andrews, B.S., Theofilopoulos, A.N., Peters, C.J., Loskutoff, D.J., Brandt, W.E. and Dixon, F.J.: Replication of dengue and junin viruses in cultured rabbit and human endothelial cells. Infection and Immunity, **20**; 776~781, 1978.
- 10) Okuno, Y., Igarashi, A. and Fukai, K.: Neutralization test for dengue and Japanese encephalitis virus by the focus reduction method using peroxidase-anti-peroxidase staining. Biken J., **21**; 137~147, 1978.
- 11) Fujita, N., Tamura, M. and Hotta, S.: Dengue virus plaque formation on microplate cultures and its application to virus neutralization. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., **148**; 472~475, 1975.
- 12) Funahara, Y.: Influences of ADP-pretreatment without apparent aggregation, and of synthetic antithrombin No. 407 on the refractory phase of rabbit platelet. ICMR annals, **1**; 43~52, 1981.
- 13) Jaffe, E.A.: Culture of human endothelial cells. Transplantation Proceedings, **12** (Suppl. D); 49~53, 1980.

●自分で実際にやれる手術書！

植 田 小 児 外 科

大阪市立保健センター外科 植田 隆著

B 5 判 364頁 図207 表18 定価9,800円(〒240円)

〒101 東京都千代田区神田多町2-11

科学評論社

振替口座東京 7-102026
電話 03-252-7768