

厚生労働科学研究費補助金  
創薬基盤推進研究事業

# 新世界ザルを用いたデングウイルス感染・ 発症動物モデル開発に関する研究

(H19-生物資源-一般-003)

平成19年度 総括・分担研究報告書

平成20（2008）年3月

主任研究者 倉根 一郎

（国立感染症研究所）

# 目 次

## I. 総括研究報告

新世界ザルを用いたデングウイルス感染・発症動物モデル開発に関する研究・・・ 1

主任研究者：倉根一郎（国立感染症研究所・ウイルス第一部）

## II. 分担研究報告

デングサルモデルの臨床的、病理学的検討・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 7

分担研究者：明里宏文（医薬基盤研究所・霊長類医科学研究センター）

デングウイルス 2 型感染新世界ザルの経時的病態解析・・・・・・・・・・・・・・・・ 11

分担研究者：高崎智彦（国立感染症研究所・ウイルス第一部）

新世界ザルを用いたデングウイルス感染・発症動物モデル開発に関する研究：実験的接  
種によるコモンマーモセットの病理組織学的変化について・・・・・・・・・・・・ 15

分担研究者：中村紳一朗（滋賀医科大学・動物生命科学研究センター）

# I. 総括研究報告書

厚生労働科学研究費補助金(創薬基盤推進研究事業)

総括研究報告書

新世界ザルを用いたデングウイルス感染・発症動物モデル開発に関する研究

主任研究者:倉根一郎(国立感染症研究所・ウイルス第一部・部長)

研究要旨: デング熱・デング出血熱は熱帯・亜熱帯において毎年数千万人の患者が発生していると推察されている。さらに、数十万人程度が致死率の高い出血熱・ショック症候群を呈する。ワクチンや抗ウイルス剤の開発には動物モデル開発が必須であるが、これまで高いレベルのウイルス血症を示す動物モデルは開発されていない。本研究において、コモンマーモセットにデングウイルス1-4型を接種したところ、いずれの型のデングウイルスを接種した個体においても血症にウイルス遺伝子が確認された。特にデングウイルス2型を接種した個体においては血中に高いレベルのデングウイルスが検出され、尿中にも持続的にウイルス遺伝子が検出された。病理学的に腎臓、肝臓、脾臓、リンパ節に病変が認められた。コモンマーモセットはデングウイルスに対して非常に感受性が高く、ワクチンや抗デングウイルス薬の評価のための動物モデルとして使用しうる可能性が示唆された。

分担研究者:

命科学研究センター 特任准教授)

明里宏文 (医薬基盤研究所・霊長類

医科学研究センター 室長)

A. 研究目的

高崎智彦 (国立感染症研究所・ウイル

ス第一部 室長)

デング熱・デング出血熱は熱帯・亜熱帯

において毎年数千万人の患者が発生してい

中村紳一郎 (滋賀医科大学・動物生

ると推察されている。さらに、数十万人が致

死率の高い出血熱・ショック症候群を呈する。デングウイルスは、ネッタイシマカ、ヒトスジシマカにより媒介されるが、近年の地球温暖化の影響によるこれら媒介昆虫の生息域拡大に伴い、温帯地域への感染拡大が懸念されている。一方、日本においても海外渡航者の増加に伴い、デングウイルスに海外渡航中に感染し、帰国後発病する輸入例が年間50例以上あり、診断されずに見逃されている例がかなりの数におよんでいると考えられる。

デングウイルスに有効な抗ウイルス薬は未だ開発されていない。デングワクチンは現在数種類の生ワクチンが開発中であり、一部は臨床試験段階である。ワクチンや抗ウイルス剤開発に必要な感染動物モデルはいまだ開発されていない。デングウイルスの感染環境は、通常ヒト-蚊-ヒトで形成されているが、ヒト以外で自然界において感受性のある動物はサルのみである。しかし、旧世界ザルにおける実験感染ではごく低レベルのウイルス血症を認めるのみであり、発熱、出血等の典型的臨床症状を呈さないことから、評価系としての疾患モデル動物としては不适当である。この問題を克服する目的で、新世界ザルであるマーモセットを用いて、デングウイルス感染・発症モデルを確立することによりデングウイルスワクチン等の評価システムを構築することを目的とした。

## B. 研究方法

1. ウイルス:デングウイルス1-4型臨床分離株を用いた。

2. サル:実験用サルは国内繁殖業者より購入したコモンマーモセットを用い、医薬基盤研究所・霊長類医科学研究センター感染症施設・ABSL2 区域にて飼育管理を行なった。

3. ウイルス感染:

実験 1:デングウイルス 1-4 型  $10^6$ - $10^7$ PFU/ml を、それぞれコモンマーモセット1頭にケタミン麻酔下で静脈内接種した。接種後3, 5, 7, 10日にそれぞれ採血、14日に安楽殺を実施し組織検体を採取した。また尿を可能な範囲で採取し血液と共にウイルス定量や生化学検査等を行なった。

実験 2:デングウイルス 2 型をマーモセット背部皮下に接種し、ウイルス接種後3日目、5日目、8日目、14日目とマーモセットを経時的に解剖し組織検体を採取した。2日目、4日目、7日目に採血し、その際に体重・体温測定を実施した。血清を分離し、凍結保存した後、一括して融解後ウイルス RNA 抽出キットにより、RNA を血清から抽出した。抽出 RNA からデングウイルス遺伝子をリアルタイム RT-PCR (TaqMan) 法により検出・定量した。また、血清型特異的の中和抗体価および交叉性中和抗体価を中和試験により、IgM

抗体価をELISA法により測定した。血漿、尿、および上記組織検体についてリアルタイムPCR法によりウイルス定量を行なった。血中抗デング抗体はIgM、IgGについてELISA法により測定した。

#### 4. 病理学的検策:

病理組織学的検索:これらの腎臓、肝臓、脾臓、体表リンパ節をホルマリン固定後、パラフィン包埋切片を作製し、HE染色を施した。

免疫組織学的検索:DENV抗原を検出するため、すべてのDENV血清型を認識するD1-4(D2)-M、D1-4(D2)-R、D1-4、D2(3H5.1)、(D1-4G2)、D1-D4(2H2)の6種の抗体を用いた免疫染色を行った。さらにCD3(T細胞)、CD20(B細胞)、HLA-DR(抗原提示細胞)、Myeloperoxidase(顆粒球)の免疫染色を行った。

(倫理面への配慮)

全ての動物実験は、倫理面も含めて、国立感染症研究所、医薬基盤研究所の動物実験委員会の審査を受けその承認を得て行った。

### C. 研究結果

#### 1. コモンマーモセットへのデングウイルス1-4型の接種(感染実験1)

デングウイルス攻撃接種後の血漿中ウ

ルスRNA量を測定した。これまで報告のあるマカク属サルでの結果と比較し、数百-数千倍高いレベルのウイルスRNAが検出された。特にデングウイルス2型感染個体では、感染後3日で $10^7$  copies/mlを越える非常に高い値を示した。また血中の抗デング抗体価について測定したところ、感染後5日からIgM抗体の、感染後5日よりIgG抗体の上昇がそれぞれ認められた。また、このデングウイルス2型感染個体で、4日目に肉眼的な血尿を呈した。5日目より採尿を行ない尿中ウイルスの有無について検討を行なったところ、感染後5-13日にウイルスRNAを検出した。デングウイルス1型、3型を接種したマーモセットでも尿中ウイルスRNAを検出した。

#### 2. コモンマーモセットへのデングウイルス2型の接種(感染実験2)

4頭のマーモセットにデングウイルス2型を接種し、経時的にウイルスRNA量を測定した。接種後2日目のウイルス血症は、最も低い個体で $9.9 \times 10^7$  copies/ml、最も高い個体で $3.0 \times 10^8$  copies/mlであった。ウイルス血症は接種後8日目に個体では、 $2.2 \times 10^6$  copies/mlであり、約1週間持続していた。ウイルス遺伝子は尿中からも検出された。尿中ウイルス遺伝子は、感染後4日目から検出され、 $2.7 \times 10^5$  copies/mlのウイルス

RNA であり、10 日目に  $8.4 \times 10^7$  copies/ml と最高値を示し、14 日目でも  $8.2 \times 10^6$  copies/ml であった。解剖後の組織の検索では、リンパ節、脾臓、肝臓、腎臓で高いデングウイルス遺伝子が検出された。感染 8 日後、14 日後には胃、盲腸、空腸、回腸でもウイルス遺伝子が検出された。

### 3. 病理学的検策

#### 1) 肉眼的検策:

デングウイルス 2 型を接種したサル腎臓は腫大し、黄褐色に褪色し、表面は粗造であった。肝臓は腫大、やや褪色し茶褐色を呈していた。脾臓やリンパ節は著しく腫大していた。デングウイルス 3 型、4 型を接種したサル腎臓はやや腫大するものの大きな変化はなく、肝臓、脾臓やリンパ節はやや腫大していた。

#### 2) 組織学的検策:

デングウイルス 2 型を接種したサル腎臓では広い間質に、リンパ球を中心とした強度の炎症細胞浸潤が見られた。この領域内の糸球体は全節性に硬化した。肝臓は少数の肝細胞が単細胞性壊死を示した。脾臓では白脾髄の大型化、特に胚中心の大型化が顕著であり、リンパ節では軽度の濾胞の拡張が認められた。デングウイルス 3 型、4 型を接種したサル腎臓では、間質にリンパ球を中心とした中等度の炎症細胞浸潤、糸球

体ではメサンギウム基質の増生が見られた。脾臓では軽度の白脾髄の拡張が認められた。

#### 3) 免疫組織学的検策:

炎症巣内には CD3 陽性の T 細胞と CD20 陽性の B 細胞がほぼ同数存在し、HLA-DR 陽性の抗原提示細胞、Myeloperoxidase 陽性の顆粒球系細胞が少数存在した。

### D. 考察

新世界ザルであるコモンマーモセットにおけるデングウイルス感受性について検討を行なった。マカク属サルと比較してデングウイルスに対して高い感受性を有することが明らかとなった。過去における新世界ザルに対するデングウイルス接種実験では、わずかにヨザルを用いたものが数報見られる程度であるが、その結果はマカク属サルと同程度となっている。なぜコモンマーモセットがデングウイルスに高い感受性を示すのかについては未だ不明である。今回の実験ではデングウイルス 2 型がコモンマーモセットにおいて最も高いウイルス増殖を示した。今回用いた 2 型ウイルス株はデング出血熱を呈した患者由来分離株であることから、強病原性を呈するような遺伝子レベルでの背景が存在する可能性もある。

デングウイルス感染後 2 日目には、ヒトデング熱患者におけるウイルス血症にかなり近

い力価のウイルス血症を起こすことが確認された。また接種後 8 日目においてもウイルス血症は検出されたことから、ワクチンや抗ウイルス剤の評価系として、十分なデングウイルス感染モデルであると考えられる。また、ウイルス血症が消失した感染後 14 日目においても各種臓器においてはウイルスが存在することが確認された。一方、尿中からも比較的長期間にわたり、デングウイルス遺伝子が検出されることが確認された。この現象はヒトのデング熱症例でも確認されすでに論文として報告されている(Mizuno Y et al.: Trans R Soc Trop Med Hyg. 101:738-739, 2007)。以上から、コモンマーモセットにデングウイルスを感染させた場合、ヒトのデング熱にも見られる病態が確認され、デング熱の病態解析のモデルとなりうる可能性が示唆された。

#### E. 結論

コモンマーモセットはデングウイルスに対して非常に感受性が高く、感染後高いレベルのウイルス血症を示す。ワクチンや抗デングウイルス薬の評価のための感染動物モデルとして使用しうる可能性がある。

#### F. 健康危機管理情報

特になし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

なし

##### 2. 学会等発表

###### 1) 国際学会

なし

###### 2) 国内学会

なし

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 特許取得

明里宏文、高崎智彦、倉根一郎。「デングウイルスのワクチン及び治療薬を開発するために好適なウイルス検査方法、及び、モデル動物」 特願 2008-035178 (整理番号: 19H491)を出願申請中

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

なし



## Ⅱ. 分担研究報告書

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）  
分担研究報告書

デングサルモデルの臨床的、病理学的検討

分担研究者 明里宏文 医薬基盤研究所霊長類医科学研究センター室長

**研究要旨**

デング熱及びデング出血熱の原因ウイルスであるデングウイルスは熱帯地方を中心として世界的に感染者が多く見られ、そのため有効なワクチン開発は急務である。このためには効率よくウイルスが感染増殖する動物モデルが不可欠である。しかし現在利用可能な動物モデルではウイルス感染増殖効率が低レベルであることから、より優れた動物モデルの開発が求められてきた。我々はこの問題を克服すべく、コモンマーモセットへのデングウイルス接種実験を行なった。その結果、コモンマーモセットはデングウイルスに対して非常に感受性が高く、これまでのマカク属サルでの結果と比較して非常に効率良くデングウイルスが感染増殖することを見出した。本成果は、デングウイルス予防ワクチン開発における前臨床試験のための評価系モデルとしてのみならず、個体レベルでのデングウイルス感染病態機序の解明において画期的なブレイクスルーとなるものと期待される。

**A. 研究目的**

デング熱は熱帯・亜熱帯の海外において年間推定2000万人の罹患者が発生しているとされ、さらにその内数万人程度が致死率の高い出血熱・ショック症候群を呈する。デング熱の原因ウイルスであるデングウイルスは、1型から4型までのウイルスが存在し、ネッタイシマカ、ヒトスジシマカにより媒介されるが、近年の地球温暖化の影響によるこれら媒介昆虫の生息域拡大に伴い、温帯地域への感染拡大が懸念されている。

現在、デングウイルスに有効な抗ウイルス薬は未開発である。一方デングワクチンは現在数種類の生ワクチンが開発中であり、一部はマカク属サルを用いた動物モデルでの有効性評価を経て臨床試験段階である。このマカク属サルモデルによるデングウイルス実験感染では、ヒトでの場合と比較してウイルス複製効率が悪くウイルス血症レベルが顕著に低いため、何ら臨床症状を呈さない。このため、候補ワクチンの有効性、安全性評

価システムとしては不十分と言わざるを得ない。さらに既感染者に存在する抗ウイルス抗体が、異なる型のデングウイルス再感染時に感染増強作用を呈することがデング出血熱の要因とされていることから、特にリスクの高い小児へのワクチン接種による病態増悪化が危惧されている。

こうした理由より、ヒトにおけるデングウイルス感染に近似したモデル動物の開発が長い間求められてきた。我々は、これまでの実験用霊長類によるデングウイルス感染実験報告において新世界ザルが殆ど用いられていないこと、に着目し、今回試験的にマーモセットへのデングウイルス接種実験を行なったところ、非常に有望な結果を得たので報告する。

**B. 研究方法**

サル攻撃接種用ウイルスとして、臨床分離株1～4型を用いた。実験用サルは国内繁殖業者より

購入したコモンマーモセットを用い、当センター感染症施設・ABSL2 区域にて飼育管理を行なった。上記臨床分離 Dengue ウイルス株 1～4 型  $10^6$ – $10^7$  PFU/ml を、それぞれコモンマーモセット 1 頭にケタミン麻酔下で静脈内接種した。接種後 3, 5, 7, 10 日にそれぞれ採血、14 日に安楽殺を実施し組織検体を採取した。また尿を可能な範囲で採取し血液と共にウイルス定量や生化学検査等を行なった。血漿、尿、および上記組織検体についてリアルタイム PCR 法によりウイルス定量を行なった。血中抗 Dengue 抗体は IgM, IgG について ELISA 法により測定した。

#### (倫理面への配慮)

全ての動物実験は、倫理面も含めて、医薬基盤研究所の動物実験委員会の審査をうけ、その承認を得て当センター感染症実験施設にて実施した。

### C. 研究結果

コモンマーモセットへの Dengue ウイルス攻撃接種後の血漿中ウイルス RNA 量の推移を表 1 に示す。これまで報告のあるマカク属サルでの結果と比較し、数百～数千倍高いレベルのウイルス RNA が検出された。特に Dengue ウイルス 2 型感染個体 (#1-2) では、day3 で  $10^7$  copies/ml を越える非常に高い値を示した。また血中の抗 Dengue 抗体価について測定したところ、day5 から IgM 抗体の、day10 より IgG 抗体の有為な上昇がそれぞれ認められ、day14 までどちらの抗体価も上昇した (図 1)。

上記の経過観察の過程で、day4 に #1-2 が肉眼的に明らかな血尿を呈した。そこで day5 より採尿を行ない尿中ウイルスの有無について検討を行なった。その結果、#1-2 では day5 から day13 に渡って持続的なウイルス RNA を検出した。同時に Dengue ウイルス 1, 3 型を接種したマーモセットでも、頻度は少ないものの有為な尿中ウイルス RNA を検出した (表 2)。

Day14 にウイルス接種ザルの剖検を行なったところ、#1-2 では左右の腎臓ともに顕著な異常が認

められたため、病理学的解析を行なった (分担研究者・中村伸一郎の報告を参照)。

以上の結果より、Dengue ウイルス攻撃接種コモンマーモセットにおいて、①血液及び尿中に非常に高いレベルのウイルス RNA が検出された、②血中ウイルス量の低下と平行して抗 Dengue 抗体価の上昇が認められた、③ Dengue ウイルス 2 型感染個体では血液及び尿中に最も高いウイルス RNA が検出されるとともに、血尿や肉眼的異常を伴う腎臓への強い障害が認められた。以上の結果より、コモンマーモセットは Dengue ウイルスに高い感受性を有していることが明らかとなった。

### D. 考察

本研究では、新世界ザルであるコモンマーモセットにおける Dengue ウイルス感受性について検討を行なった。その結果、我々の期待を上回り、これまで多く用いられてきたマカク属サルと比較して遥かに Dengue ウイルスに対して高い感受性を有することが明らかとなった。過去における新世界ザル・Dengue ウイルス接種実験では、わずかにヨザルを用いたものが数報見られる程度であるが、その結果はマカク属サルと同程度となっている。こうした状況で、他の新世界ザルも同様であろうといった先入観で先人が特に検討しなかったのもであろうと推測される。なぜコモンマーモセットが Dengue ウイルスに高い感受性を示すのかについては、現時点では不明である。コモンマーモセットが分布する南米ブラジル一帯は、Dengue 熱ウイルスの媒介昆虫であるネッタイシマカの分布域とほぼ一致している。従って、理論的には Dengue ウイルス感染により感受性の高いコモンマーモセットは淘汰され、抵抗性を有する個体が種として生残していても不思議ではない。この辺りについては、今後の詳細な調査が必要であり、大変興味深い。

本結果から、Dengue ウイルスの中で 2 型が最もコモンマーモセットにおいて感染増殖効率が高いことが示唆された。従って、少なくとも今回用いた 2 型ウイルス株は今後のコモンマーモセッ

ト・デング感染発症モデル確立に向けて有用であると考えられる。今回用いた2型ウイルス株はデング出血熱を呈した患者由来分離株であることから、何らかの強病原性を呈するような遺伝子レベルでの背景が存在するのかも知れない。これらの疑問については、今後さらに本2型ウイルス株を用いた再現性検討と共に、複数のウイルス株を用いたコモンマーモセット感染実験により明らかにすることが可能と考えられる。

#### **E. 結論**

本研究では、新世界ザルであるコモンマーモセットにおけるデングウイルス感受性について検討を行なった。その結果、コモンマーモセットはデングウイルスに対して非常に感受性が高く、こ

れまでのマカク属サルでの結果と比較して非常に効率良くデングウイルスが感染増殖することを見出した。本成果は、デングウイルス予防ワクチン開発における前臨床試験のための評価系モデルとしてのみならず、個体レベルでのデングウイルス感染病態機序の解明において画期的なブレークスルーとなるものと期待される。

#### **G. 研究発表**

なし

#### **H. 知的財産権の出願・登録状況**

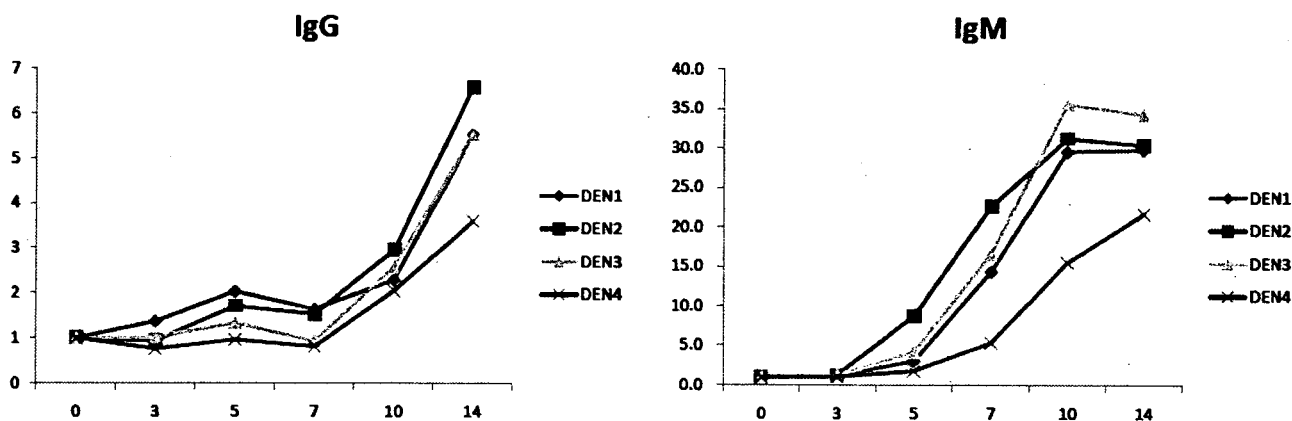
明里宏文、高崎智彦、倉根一朗：デングウイルス検査方法及びモデル動物（2008年、特許出願中）

### Viral RNA in serum (copies/ml)

Virus type & ID number	days after infection					
	3	5	7	10	14	
DEN1 #1-1	$3.8 \times 10^5$	$5.0 \times 10^5$	-	-	-	
DEN2 #1-2	$1.6 \times 10^7$	$1.0 \times 10^5$	-	-	-	
DEN3 #1-3	-	$5.5 \times 10^4$	-	-	-	
DEN4 #1-4	$2.5 \times 10^4$	-	-	-	-	

- = undetected  
N.T. = not tested

表 1 : コモンマーモセットへのデングウイルス接種実験 : 血中ウイルス RNA 量の推移



Index = OD(serum)/OD(pre-serum) on each individual  
OD: optical density

図 1 : コモンマーモセットへのデングウイルス接種実験 : 血中抗デングウイルス抗体価の推移

### Viral RNA in urine (copies/ml)

Virus type & ID	days after infection										
	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	
DEN1 #1-1	$7.5 \times 10^4$	-	N.T.	-	N.T.	N.T.	-	-	-	-	
DEN2 #1-2	$3.8 \times 10^3$	$2.5 \times 10^4$	$7.0 \times 10^4$	$4.0 \times 10^4$	$5.0 \times 10^4$	$3.7 \times 10^4$	$6.5 \times 10^4$	$4.2 \times 10^3$	$1.0 \times 10^4$	-	
DEN3 #1-3	-	-	N.T.	$4.8 \times 10^4$	N.T.	-	NT	$8.5 \times 10^4$	-	-	
DEN4 #1-4	-	-	N.T.	-	N.T.	N.T.	-	-	-	-	

- = undetected  
N.T. = not tested

表 2 : コモンマーモセットへのデングウイルス接種実験 : 尿中ウイルス RNA 量の推移

分担研究報告書

デングウイルス2型感染新世界ザルの経時的病態解析

分担研究者：高崎智彦（国立感染症研究所・ウイルス第一部・室長）

デングウイルス感染によるデング熱・出血熱は熱帯、亜熱帯を中心に年間に数千万人が罹患し、数十万人がデング出血熱を発症しているが、ワクチンは開発段階であり、その実用化は急務である。このためウイルスが効率よく感染増殖するヒトに近い動物モデルは必要である。デングウイルスには4つのウイルス型があり、それぞれの型のウイルスをマーマセツト1頭に接種したところ、2型が特に高いウイルス血症をきたしたことから、今回は4頭のマーマセツトにデングウイルス2型を接種し、経日的（接種後3日、5日、8日、10日、14日）に解剖し、デングウイルスの各臓器での増殖をウイルス学的に検討した。解剖までの観察期間中は臨床症状の有無を観察し、経日的に採血・採尿し、ウイルスの検出、血尿の有無および一般血液検査、血小板数、肝機能、腎機能を経日的に測定した。ヒトにおこるようなデング熱症状を認めなかったが、ワクチン効果・抗デングウイルス薬の評価のための感染動物モデルとして十分な高さで期間のウイルス血症をきたすことが、4個体すべてにおいて確認された。

A.研究目的

マーマセツトがマカク属サルに比べて、デングウイルスに対して高い感受性を有することを1から4型のウイルスに関して各1頭ずつの感染実験で確認された。この実験で2型ウイルス感染個体が高最も高いウイルス増殖を示した。そこで今回はデングウイルス2型を4頭のマーマセツトに接種し、経日的（接種後3日、5日、8日、10日、14日）に解剖し、デングウイルスの各臓器での増殖をウイルス学的に検討した。デングウイルスに感染したマーマセツトの体内で、ウイルスがどのように増殖し拡散

していくのか。マーマセツトの各臓器のデングウイルスに対する感受性およびウイルス増殖動態を解析した。

B.研究方法

デングウイルス2型をマーマセツト背部皮下に0.5mL接種し、ウイルス接種後3日目、5日目、8日目、14日目とマーマセツトを経時的に解剖した（表1）。標的臓器になりうる可能性のある臓器を摘出し、ウイルス学的検査および病理学的検査に供した。採尿・採便・尿検査は毎日採材した。2日目、4日目、7日目に採血し、その際に体重・

体温測定を実施した。血液検査の項目は、血算と血清生化学 (TP, ALB, BUN, GLU, GOT, GPT, CRE, ALP, LDH) 検査を実施した。血清を分離し、凍結保存した後、一括して融解後ウイルス RNA 抽出キット (Roche 社) により、RNA を血清から抽出した。抽出 RNA からデングウイルス遺伝子をリアルタイム RT-PCR (TaqMan) 法により検出・定量した。また、血清型特異的中和抗体価および交叉性中和抗体価を中和試験により、IgM 抗体価を ELISA 法により測定した。

ABI Prism 7000 Sequence Detection System instrument で次の条件で RT-PCR 反応を行った。48°C で 30 分 (Reverse Transcription)、95 °C で 10 分間 denaturation し、「95 °C で 15 秒 (Denaturation) → 57 °C で 1min (Annealing)」を 40 回繰り返す。各血清型の合成 RNA を基準として、ウイルス量を定量した。

### C. 研究結果

デングウイルス接種後 2 日目のウイルス血症は、最も低い個体で  $9.9 \times 10^7$  copies/mL、最も高い個体で  $3.0 \times 10^8$  copies/mL であった。ウイルス血症は接種後 8 日目に剖検した個体で、 $2.2 \times 10^6$  であり、約 1 週間持続した。また、ウイルス遺伝子は尿中からも検出された。尿中ウイルス遺伝子は、感染後 4 日目から検出され、 $2.7 \times 10^5$  copies/mL のウイルス RNA であり、10 日目に  $8.4 \times 10^7$  copies/mL と最高値を示し、14 日目でも  $8.2 \times 10^6$  copies/mL であった。血液検査に特徴的な異常は認めず、肉眼的血尿もなかったが、尿潜血が確認された。

一方、各組織では、リンパ節、脾臓、肝臓、腎臓で高いデングウイルス遺伝子が検出された。ウイルス感染 8 日後、14 日後には胃、盲腸、空腸、回腸でもウイルス遺伝子が検出された。

### D. 考察

コモンマーマオセットにおいては、デングウイルス感染後 2 日目には、ヒトにおけるデング熱のウイルス血症にかなり近い力価のウイルス血症を起こすことが接種した 4 個体ともに確認された。また接種後 8 日目においてもウイルス血症は検出されたことから、ワクチンや抗ウイルス剤の評価系動物モデルとして、十分なデングウイルス感染モデルであると考えられる。また、ウイルス血症が消失した感染後 14 日目においても各種臓器においてはウイルスが存在することが確認された。このことは、ヒトにおいてもウイルス血症消失後も、臓器中ではウイルスが存在することを示唆した。実際、急性症状消失後も肝機能障害が持続する場合があるなどの現象と関連があるかもしれない。また、臓器移植、骨髄移植の観点からもデング熱患者の急性症状消失後も、移植には不适当であることが示唆された。一方、尿中からも比較的長期間にわたり、デングウイルス遺伝子が検出されることが確認された。この減少はヒトのデング熱症例でも確認されず既に論文として報告されている (Mizuno Y, Kotaki A, Harada F, Tajima S, Kurane I, Takasaki T. Confirmation of dengue virus infection by detection of dengue virus type 1 genome in urine and saliva but not in plasma. Trans R Soc Trop Med Hyg.

2007;101(7):738-739)。このことから、コモンマーモセットにデングウイルスを感染させた場合、ヒトのデング熱に特徴的な高熱、発疹、血小板減少などの症状をきたすことはないが、それなりに共通する現象(病態)をきたすことが確認され、デング熱・デング出血熱の病態解析のモデルとなりうるものと考えられる。

#### E. 結 論

コモンマーモセットにデングウイルスを感染させた場合、ヒトにおこるようなデング熱症状を認めなかったが、ワクチン効果・抗デングウイルス薬の評価のための感染動物モデルとして十分な高さと期間のウイルス血症をきたすことが、今回用いた4個体すべてにおいて確認された。

#### F. 健康危機情報

な し

#### G. 研究発表

な し

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

明里宏文、高崎智彦、倉根一郎. 特願2008-035178(整理番号:19H491)を出願申請中。

【課題】デングウイルスのワクチン及び治療薬を開発するために好適なウイルス検査方法、及び、モデル動物



表1 <動物実験スケジュール>

動物番号	#09	#10	#11	#12
接種ウイルス	DENV 2	DENV 2	DENV 2	DENV 2
day 0	プレ採血 <sup>①</sup> 、ウイルス接種			
day 1				
day 2	採血 <sup>②</sup>			
day 3	採血 <sup>①</sup> 、解剖			
day 4		採血 <sup>②</sup>		
day 5		採血 <sup>①</sup> 、解剖		
day 6				
day 7		採血 <sup>②</sup>		
day 8		採血 <sup>①</sup> 、解剖		
day 9				
day 10				
day 11				
day 12				
day 13				
day 14				採血 <sup>①</sup> 、解剖

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）

分担研究報告書

新世界ザルを用いたデングウイルス感染・発症動物モデル開発に関する研究  
実験的接種によるコモンマーモセットの病理組織学的変化について

分担研究者 中村 紳一郎 滋賀医科大学・動物生命科学研究センター・特任准教授

研究要旨：デング熱ウイルス（DENV）の適切な動物モデルを開発するため、コモンマーモセットに異なる血清型の DENV1-4 を実験的に接種し、14 日後にそれぞれの感受性について病理組織学的に検索した。その結果、DENV2 接種動物で腎臓間質への強度なリンパ球浸潤、脾臓ならびに各リンパ節の濾胞の拡張が確認された。次に DENV2 接種後の感染期間 3、5、8、14 日と経時的な変化を観察したところ、8 と 14 日目の動物に腎臓間質への中等度から強度のリンパ球浸潤、脾臓ならびに各リンパ節の濾胞の拡張が確認された。これらの炎症巣は主に CD3 陽性の T 細胞と CD20 陽性のから構成されていた。腎臓、脾臓およびリンパ節から免疫組織化学的に DENV 抗原の検出を試みたが、明確な免疫反応は得られなかった。

A. 研究目的

デング熱の死亡例の典型的な肉眼像は、全身性の水腫と出血、血様の腹水や胸水の貯留を主徴とする。病理組織像としては各種臓器での水腫と出血、類洞でのクッパー細胞およびリンパ球の増数、各臓器の血管周囲でのリンパ球浸潤、骨髓低形成などが見られている。一方、これらヒトと同等の病態を現すモデル動物はこれまでに知られていない。コモンマーモセットへの実験的接種によって、ヒトと類似する病変が見られるか否かを病理組織学的に解析し、ヒトのモデル動物として外挿可能かどうか判断することが、この分担研究の目的である。

B. 研究方法

実験 1：デング熱ウイルス（DENV）の異なる血清型 1-4 を、成獣・オスのコモンマーモセット各 1 匹ずつ計 4 匹に接種し、14 日後、病理解剖に供した。  
実験 2：実験 1 の結果を元に DEVN2 の感染経過に伴う変化を確認した。成獣・オスのコモンマーモセット 4 匹に DEVN2 を接種後、3、5、8、14 日後に各 1 匹ずつ、病理解剖に供した。  
病理組織学的検索：これらの腎臓、肝臓、脾臓、体表リンパ節をホルマリン固定後、パラフィン包埋切片を作製し、HE 染色を施した。  
免疫組織学的検索：DENV 抗原を検出

するため、すべての DENV 血清型を認識する D1-4(D2)・M、D1-4(D2)・R、D1-4、D2(3H5.1)、(D1-4G2)、D1-D4(2H2)の 6 種の抗体を用いた免疫染色を行った。陽性対照として、DEVN2 感染 Vero 細胞のペレットをホルマリン固定、パラフィン包埋したものをを用いた。さらに炎症巣に参加する細胞を特定するため、CD3(T 細胞)、CD20(B 細胞)、HLA-DR (抗原提示細胞)、Myeloperoxidase (顆粒球)、4 種の炎症細胞マーカーを一次抗体とした免疫染色を行った。

(倫理面への配慮)

本実験は医薬基盤研究所霊長類医科学研究センターの動物実験委員会で適正な審議によって承認され、適切な飼育ならびに管理環境の元を実施されたものである。

### C. 研究結果

実験 1:肉眼的に DENV2 が接種された動物の腎臓は腫大、黄褐色に褪色し、表面は粗造であった。肝臓は腫大、やや褪色し茶褐色を呈していた。脾臓やリンパ節は著しく腫大していた。DENV3 と 4 が接種された動物の腎臓はやや腫大するものの大きな変化はなく、肝臓、脾臓やリンパ節はやや腫大していた。DENV1 が接種された動物に大きな変化はなかった。

DENV2 を接種された動物の腎臓では組織学的に、広い範囲の間質で、リンパ球を中心とした強度の炎症細胞浸潤が見られた。この領域内の糸球体は全節性に硬化していた。肝臓は少数の肝細胞が単細胞性壊死を示していた。脾臓では

白脾髄の大型化、特に胚中心の大型化が顕著だった。リンパ節では軽度の濾胞の拡張が認められた。DENV3 と 4 を接種された動物の腎臓では、間質にリンパ球を中心とした中等度の炎症細胞浸潤、近接する糸球体ではメサンギウム基質の増生が見られた。脾臓では軽度の白脾髄の拡張が認められた。肝臓およびリンパ節では著変は認められなかった。DENV1 が接種された動物では腎臓の間質に非常に軽度のリンパ球浸潤が認められた以外、他の臓器では大きな変化は認められなかった。

免疫組織化学的には DENV2 感染 Vero 細胞は D1-4 以外の 5 種の抗体に陽性像が認められた。一方、本実験では、いずれの動物の、いずれの臓器においてもウイルス抗原に対する明らかな陽性像は認められなかった。炎症細胞マーカーに対しては、炎症巣内には CD3 陽性の T 細胞と CD20 陽性の B 細胞がほぼ同数存在し、HLA-DR 陽性の抗原提示細胞、Myeloperoxidase 陽性の顆粒球系細胞が少数存在した。

実験 2: 3、5 日目の動物には肉眼的に大きな変化は認められなかった。8、14 日目の腎臓は褪色し、表面は粗造だった。他の臓器に大きな変化は見られなかった。

組織学的には 8 日目の腎臓間質に中等度、14 日目には強度なリンパ球を中心とした炎症細胞浸潤が認められた。この病巣内の糸球体はおおむね全節性ないしは分節性の効果を示していた。

免疫組織化学的に、ウイルス抗原に対する明らかな陽性像は認められなかつ

た。腎臓の炎症巣の炎症細胞は実験 1 と同様、主に CD3 陽性の T 細胞と CD20 陽性の B 細胞から構成されていた。

#### D. 考察

以上の結果から DENV2 がコモンマーモセットの腎臓に強い病変を惹起することが明らかとなった。この結果は、1) 他の分担研究者による RT-PCR の結果で、腎臓に強いウイルス RNA シグナルが検出されたこと、2) 実験 2 で実験 1 の結果が病理学的にも再現されたこと、などからも支持される。

今回の実験では、いわゆる出血熱のような病態は呈さなかった。ヒトでいわゆる「デング熱」の症状を呈するのは、一つの血清型に感染し、その後に他の血清型に感染した場合が多いとされる。さらに病態をヒトに近づけるための工夫として、複数回、異なった血清型の DENV を接種するという方法も必要と考えられる。

さらにヒトの病態では、その増悪に際して免疫複合体の介在が指摘されている。コモンマーモセットのモデルでは腎臓の病巣内の糸球体に硬化病変が認められ、今後、この病変形成に免疫複合体の関与があるかどうか、検討していきたい。また、今回の実験では病変からの明確なウイルス抗原検出が不可能だったが、新たな DENV 抗体を入手し検討中である。

#### E. 結論

DENV に感受性を示す適切な *in vivo* の実験系自体が存在しない中、コモンマー

モセットの腎臓は DENV2 に対する明らかな感受性を示した上、病変も形成した。動物モデルとしての可能性が広がることになった。

#### G. 研究発表

1. 論文発表  
該当なし。
2. 学会発表  
該当なし。

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし。