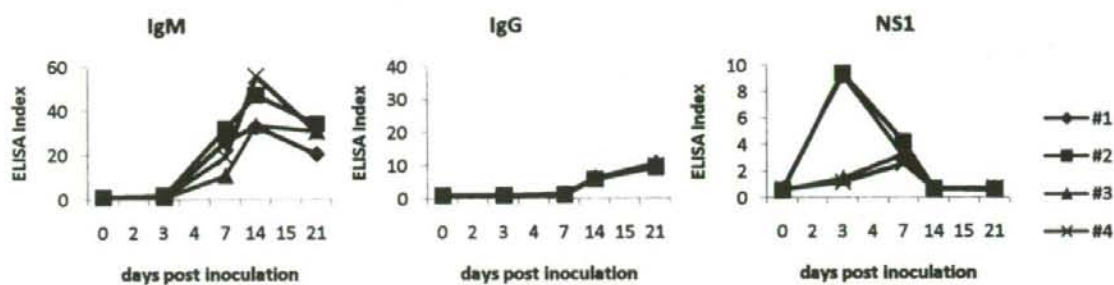


初感染



再感染

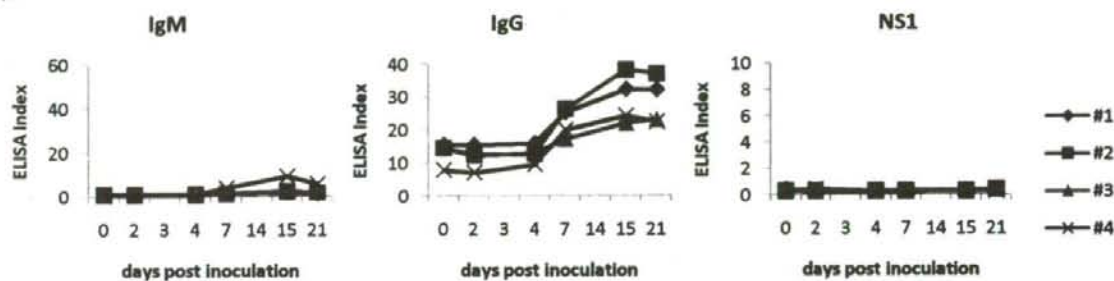


Fig. 1 デング2型ウイルスの初感染および再感染における血中抗体価および抗原量の推移

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-タマリン実験感染モデルの臨床的、病理学的検討

研究分担者 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

我々はこれまでの研究において、コモンマーモセットが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。今年度は、同じ新世界ザルでありマーモセットに近縁のアカテタマリンを用いたデングウイルス攻撃試験を行った。その結果、アカテタマリンはデングウイルスに対してコモンマーモセットと比較しやや低レベルながら高い感受性を持つことが明らかとなった。今後はヒトおよび各サル種間でのデングウイルス感染機構に関する詳細な比較検討がデング熱・デング出血熱発症モデル開発に向けて必要であると考えられた。

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、ヒトと同様の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。

こうした理由から、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、昨年度新世界ザルであるコモンマーモセットが、デングウイルスに高感受性を示すことを報告した。今年度は、コモンマーモセットと同じ新世界ザルでありオマキザル科に分類されるアカテタマリンへのデングウイルス接種実験を行ない、そのデングウイルスへの感受性について比較検討を行なった。

B. 研究方法

サル攻撃接種用ウイルスとして、臨床分離株デングウイルス2型（DHF0663株）を用いた。実験用サルはアカテタマリンを用い、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 Dengue ウイルス 2 型 10^7 PFU/ml を、アカテタマリン 2 頭にケタミン麻酔下で静脈内接種および皮下接種した。接種後 1、3、5、7 日にそれぞれ採血、7 日に安楽殺を実施し組織検体を採取した。また尿および糞便を採取し、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、糞便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 および IgG について ELISA 法により測定した。また、Dengue ウイルス抗原 NS1 蛋白を ELISA 法にて測定した。

(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

アカテタマリンへの 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。昨年度に報告した、Dengue ウイルス 2 型 (DHF0663 株) 接種コモンマーモセットにおける血漿中ウイルス RNA 量は、ピーク時平均 2×10^8 copies/ml であったのに比べ、アカテタマリンでは 1/10~1/100 程度であった。興味深いことに、経皮接種個体 #11 の場合と比べ、静脈内接種個体 #17 では血漿中ウイルス RNA 量および Dengue ウイルス抗原 NS1 蛋白量は、#17 では #11 と比べ約 10 倍高値を示した (表 1, 図 1)。また抗 Dengue 抗体価について測定したところ、IgM 抗体価は、#11 では上昇の度合いは低かったが、#17 では Day=3 以降から高い上昇がみられた (図 2)。IgG 抗体価についても、同様に #17 個体において、Day=3 以降から上昇していた。血液の生化学検査を行ったところ、特に腎臓機能の低下を示唆する BUN 値の上昇が見られた (図 3)。

感染 1 週後、#11、#17 個体の剖検を行ない、病理学的解析を行なったが、特に異常所見は認められなかった。次に剖検時に採取した組織サンプル中におけるウイルス RNA 定量結果を表 2 に示す。

コモンマーモセットの場合と比較し、特にリンパ組織におけるウイルス RNA 量が低レベルであった。なお尿および糞便からウイルス RNA は検出されなかった。

以上をまとめると、Dengue ウイルス攻撃接種アカテタマリンにおいて、①血漿中に比較的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、特に静脈内ウイルス接種個体 (#17) において IgM および IgG 抗体価の上昇とウイルス抗原 NS1 蛋白量の顕著な上昇が認められた、③マーモセットでは認められた血尿や肉眼的異常を伴う腎臓への強い障害は認められなかったが、BUN 値の上昇により感染 7 日目以降に腎臓疾患が誘発される可能性が示唆された。これらのことから、アカテタマリンはコモンマーモセットよりやや弱いものの Dengue ウイルスに感受性を有し、またウイルス接種方法として静脈内接種が有効であることが示された。

D. 考察

本研究では、新世界ザルであるアカテタマリンにおける Dengue ウイルス感受性について検討を行なった。その結果、アカテタマリンはコモンマーモセットやや弱いものの、Dengue ウイルスに対して感受性を持つことが示された。過去における新世界ザルを用いた Dengue ウイルス感染実験では、ヨザルを用いたものが数例報告されている程度であるが、その感受性はマカク属ザルと同程度であった。少なくとも今回用いた 2 型ウイルス株に関する限り、コモンマーモセットが Dengue ウイルスへの感受性が最も高く、腎臓疾患を誘発し得ることから、Dengue 動物モデルとしての最有力候補と考えられる。コモンマーモセットはアカテタマリンと同じ新世界ザルでありオマキザル科に分類されるが、なぜコモンマーモセットがアカテタマリンより高い感受性を示すのか現時点では不明である。今年度までの結果により、アカテタマリンの場合と比較しコモンマーモセットでは特にリンパ組織におけるウイルス RNA 量が高レベルであった。従って、この差異が血中ウイルス RNA

値の違いを示した要因と考えられる。今後、*in vivo*, *in vitro* 研究によるヒト、旧世界ザルおよび新世界ザル間での Dengue ウイルス感染機構に関する詳細な比較検討が必要であると考えられる。

世界的に非常に多くの Dengue ウイルス感染者および Dengue 熱・Dengue 出血熱罹患者がいるにも関わらず、Dengue ウイルス関連疾患への有効な抗ウイルス薬、治療薬は未開発である。一方 Dengue 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 Dengue 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、ヒトと同様の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 Dengue ウイルス再感染時に感染増強作用を呈することが Dengue 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。

こうしたことから、我々が新たに開発した新世界ザルへの Dengue ウイルス感染系をベースとして、その感染機序や免疫応答解析をさらに進めることで Dengue 熱・Dengue 出血熱発症モデル開発の一助となるものと期待される。

E. 結論

本研究では、新世界ザルであるアカテタマリンにおける Dengue ウイルス感染実験を行ない、ウイルス学的、病理学的見地から検討を行なった。その結果、アカテタマリンは Dengue ウイルスに対してコモンマーマセットと比較しやや低レベルながら高い感受性を持つことが明らかとなった。今後はヒトおよび各サル種間での Dengue ウイルス感染機構に関する詳細な比較検討が必要であると考えられた。

G. 研究発表

1. 学会発表

大松勉、平山隆則、小滝徹、伊藤美佳子、片貝祐子、中村紳一朗、明里宏文、高崎智彦、倉根一郎
マーマセットを用いた Dengue ウイルス感染モデルの構築

第56回日本ウイルス学会学術集会（岡山）平成20年10月26日

2. 論文発表

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：Dengue ウイルス検査方法及びモデル動物（特願 2008-35178）

viral RNA in plasma from Tamarin infected with DENV-2				
	days post-infection			
	1	3	5	7
#11	2.7x10 ⁶	1.2x10 ⁶	1.7x10 ⁴	-
#17	2.0x10 ⁷	3.6x10 ⁷	2.2x10 ⁶	1.5x10 ⁴
-: undetected			copies/ml(plasma)	

表1：アカテタマリンへのデングウイルス接種実験：血中ウイルス RNA 量の推移

viral RNA in each organ		
	#11	#17
大脳	2.6x10 ¹	8.1x10 ¹
小脳		2.9x10 ¹
胸腺	1.5x10 ¹	
心臓		3.7x10 ¹
肺		
胃		
小腸		
大腸	2.0x10 ¹	
肝臓	8.3x10 ⁰	9.4x10 ²
腎臓	3.1x10 ²	
脾臓	5.6x10 ³	1.2x10 ⁴
副腎	9.5x10 ¹	7.2x10 ³
膀胱		
鼠径リンパ節		
腸間膜リンパ節	9.3x10 ²	4.5x10 ¹
皮膚	2.3x10 ³	
大動脈		
子宮	6.1x10 ¹	
卵巣	1.3x10 ¹	7.6x10 ¹
膵臓	9.9x10 ²	5.0x10 ⁴
copies/μg of total RNA		

表2：アカテタマリンへのデングウイルス接種実験：組織中におけるウイルス RNA の定量

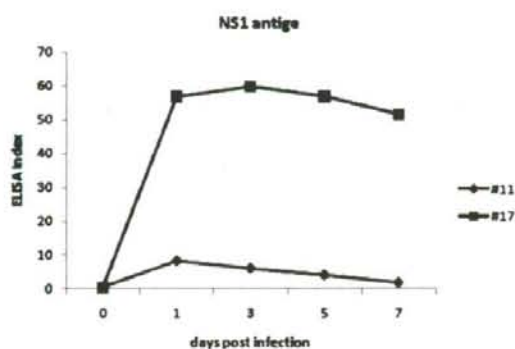


図1：アカテタマリンへのデングウイルス接種実験：血中 NS1 抗原量の推移

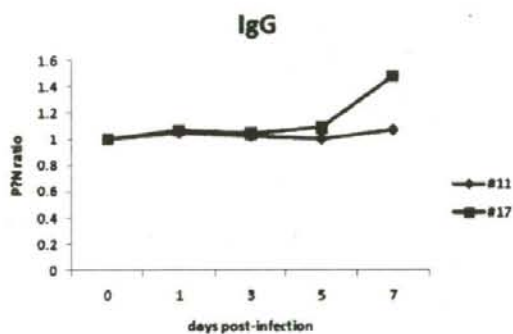
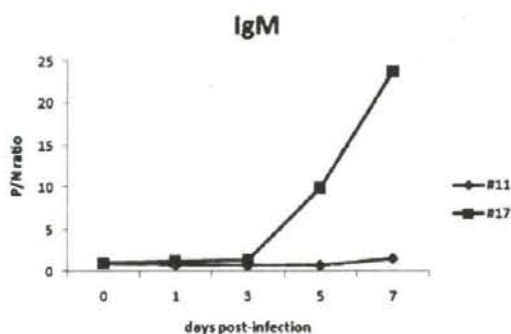


図2：アカテタマリンへのデングウイルス接種実験：血中 IgM, IgG 抗体価の推移

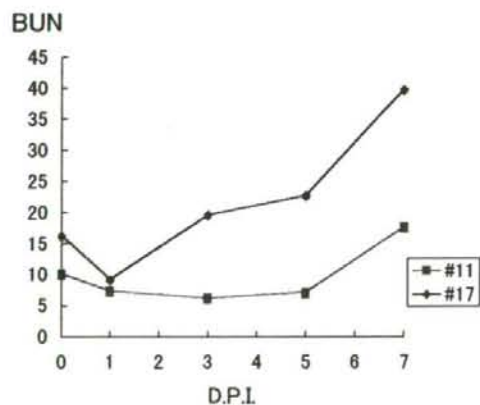


図3：アカテタマリンへのデングウイルス接種実験：血漿中 BUN 値の推移

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熱ウイルス感染・発症動物モデル開発に関する研究：
病理組織学的検索

研究分担者 中村 紳一朗 滋賀医科大学准教授

研究要旨 新世界ザルをデング熱ウイルス（DENV）の適切な動物モデルとして確立するため、病理組織学的な解析を行っている。コモンマーモセットには間質性腎炎を中心とした泌尿器系の病理組織学的変化が見られた（昨年度実績）が、アカテタマリンでは明らかな病変が見られなかった。ヒトで異なる DENV 株が複数回感染すると重篤な症状を呈するが、DENV 2 を実験的に重複感染させたコモンマーモセットには明確な病変が見られなかった。病変形成部でウイルス抗原を検出するために DENV に対する各種抗体を用いた免疫染色を試みたところ、抗 DENV 3B 抗体と抗 DENV D1-11 抗体は DENV 感染 Vero 細胞に良好な染色性を示したが、DENV 感染マーモセットの腎臓では良好な染色性が得られなかった。

A. 研究目的

デング熱患者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。昨年度、コモンマーモセットへの実験的接種によって、腎臓に間質性腎炎を中心とする病変を確認したが、さらに別な新世界ザル種がヒトに類する変化を示すかどうか、病理組織学的に確認した。ヒトでは初感染と異なる DENV 株の再感染で重篤な症状を示すが、同じ DENV 株の重複感染は逆に防御的に働くのか否かコモンマーモセットを用いて病理組織学的変化を確認した。また病変の中でウイルス抗

原がいかなる挙動を示しているかを確認するため、免疫組織化学による検出系の確立を目指した。

B. 研究方法

（材料）メス・アカテタマリン 2 例に DENV2 を感染させ、7 日後に病理解剖を行った。オス・マーモセット 2 例に DENV2 を接種、さらに 6 ヶ月後に DENV2 を再接種、その 7 日後に病理解剖を行った。それぞれの各主要臓器をホルマリン固定またはパラホルムアルデヒド固定、パラフィン包埋材料を作製し、HE 染色を行った。

DENV2 が播種された Vero 細胞を回収し、遠心の後ペレットを作製、パラホルムアルデヒド固定を行い、パラフィン包埋材料を作製した。また、昨年度に実施の DENV2

を接種 14 日後に解剖されたオス・コモンマーモセットおよび非接種オス・コモンマーモセット、それぞれの腎パラフィン包埋材料を用意した。これらを免疫染色の *in vivo* 材料ならびに *in vitro* 材料として用いた。

(免疫染色) DENV に対する免疫染色の一次抗体として、抗 DENV 3B 抗体、抗 DENV D1-11 抗体、(以上マウス・モノクローナル抗体)、抗 DENV SQ93-2239 抗体 (ウサギ・ポリクローナル抗体) を用いて酵素抗体法を行った。また FITC 標識抗 DENV HB-112 抗体を用いて直接蛍光抗体法を行った。

C. 研究結果

2 例のアカテタマリンはともに脾臓、肝臓で背景病変と考えられる髄外造血が認められた。また一例は脾臓で白脾髄の大型化が認められた。明確な炎症などは確認されなかった。一方、2 回 DENV2 を感染させた 2 例のコモンマーモセットは、空腸の絨毛の伸張と固有層での中等度のリンパ球浸潤を認めた。しかし炎症などの明らかな破壊性病変は見られなかった。

酵素抗体法による免疫染色では抗 DENV 3B 抗体、抗 DENV D1-11 抗体が DENV2 感染 Vero 細胞の細胞質に明瞭な陽性像を示した。DENV2 感染マーモセットの腎臓で近位尿管上皮細胞の細胞質に顆粒状の陽性像が見られたが、非感染マーモセットの同部位でも同様の陽性像が認められた。抗 DENV SQ93-2239 抗体は DENV2 感染 Vero 細胞、DENV2 感染および非感染マーモセットの腎臓、いずれにおいても非常に強い一様な非特異反応を示した。一方、FITC 標識抗 DENV HB-112 抗体は DENV2 感染 Vero 細胞の細胞質に明瞭な陽

性像を示した。しかし先述の抗体と同様に、DENV2 感染マーモセットの腎臓近位尿管上皮細胞の細胞質だけでなく、非感染動物にも同様の顆粒状の陽性像が見られた。

D. 考察

昨年度の実績でコモンマーモセットに明らかな泌尿器症状と間質性腎炎が見られたのに対し、アカテタマリンには明らかな病変が見られず、コモンマーモセットの有効性が改めて明確となった。

ヒトの臨床的な事例では、同じ株の DENV が別の時期に複数回感染すると防衛的に働き、逆に別の株に複数回暴露されたときには、重篤な症状を示すとされている。DENV2 を 2 回感染させたコモンマーモセットには、単回感染させたときに見られるような腎病変が見られなかったため、ヒトと同様の同株感染における防衛的反応が惹起されたものと考えられた。

抗 DENV 3B 抗体、抗 DENV D1-11 抗体と FITC 標識抗 DENV HB-112 抗体は培養細胞では明確な陽性像が見られたが、腎臓では非感染動物にも同様の陽性像が見られたことから、腎臓の陽性像は非特異反応と考えた。この反応は FITC で標識された抗 DENV HB-112 抗体の直接法でも認められたので、酵素抗体法といった手法や手続きの問題でなく、新世界ザルのある種の細胞には DENV 抗体のエピトープに類似する何らかのタンパク質があるものと考えられた。引き続き、異なるエピトープを認識する有効な抗体を捜していく予定である。

E. 結論

新世界ザルの中では、コモンマーモセッ

トが明確な病理組織学的変化を示す動物種である。DENV の複数回の感染では、病理組織学的変化を示さず、防御的に働いていることが示唆された。何種類かの抗 DENV 抗体は新世界ザルの何らかのタンパク質を非特異的に認識している可能性が考えられた。

G. 研究発表

1. 論文発表

なし。

2. 学会発表

なし。

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし。