

2009 11003A

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21年度 総括・分担研究報告書

平成22 (2010) 年 3 月

研究代表者 倉 根 一 郎

(国立感染症研究所)

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21年度 総括・分担研究報告書

平成22 (2010) 年 3 月

研究代表者 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

研究代表者：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

マーマセットを用いたデング出血熱発症モデルの構築とウイルス学的検討

－ウイルス株間の病原性の比較－・・・ 7

研究代表者：倉根一郎（国立感染症研究所・ウイルス第一部）

マーマセットを用いたデングワクチン評価系の構築とウイルス学的検討

－ウイルス接種量の検討と感受性の評価－・・・ 15

研究分担者：高崎智彦（国立感染症研究所・ウイルス第一部）

デング実験感染モデルの臨床的、病理学的検討・・・ 23

研究分担者：明里宏文（京都大学・霊長類研究所）

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（デング熱ウイルス抗原の組織学的検出について）・・・ 29

研究分担者：中村紳一郎（滋賀医科大学・動物生命科学研究センター）

I. 総合研究報告書

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

研究代表者：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：コモンマーモセツトがデングウイルス（DENV）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 DENV が感染増殖することを見出した。本年度は、2型デングウイルス野外分離株3株に対するマーモセツトの感受性について検討を行った。全ての株で高いウイルス血症が誘導された。一方で、臨床症状の指標の一つである体温変動に関しては接種株間で異なる傾向が認められた。免疫応答の解析においては、特異抗体とともに、CD8 陽性 T 細胞の顕著な活性化が同時に誘導されていることが示された。さらに、感染マーモセツト血清を用いることにより、脾臓、リンパ節のリンパ系細胞またはマクロファージ、肝臓のクッパー細胞にウイルス抗原が存在することが示された。

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）

高崎智彦（国立感染症研究所・ウイ
ルス第一部 室長）

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）

A. 研究目的

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 100 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適当である。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、及びデング出血熱の病態解明のためのモデル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 2 型臨床分離株 3 株 (DHF0663 株、D2/Hu/Jamaica/77/2007NIID (Jam/77/07) 株、D2/Hu/Maldives/77/2008NIID (Mal/77/08) 株) を用いた。
2. サル：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：

マーモセット 6 頭を用いて実施した。腹腔内にテレメーターを挿入したマーモセットに 2 型デングウイルス 3 株をそれぞれ 2 頭ずつ皮下接種し、接種前および接種後 2, 4, 7, 14, 21 日目に採血を行い、血中ウイルス RNA 量、NS1 抗原量およびデングウイルス特異的 IgM および IgG 抗体量について

検索すると共に、血液検査を実施し血球数及び生化学値について検索した。同時に接種後 14 日目まで毎日尿を採取し、尿中からのウイルス RNA の検出も試みた。また、臨床症状の指標として経時的な体温変動についても検索を行った。

血中および尿中ウイルス RNA 量は血漿および尿より RNA を抽出し、TaqMan RT-PCR 法を用いてウイルス RNA 量を定量した。NS1 抗原量の検出には NS1 antigen capture ELISA (Biorad) を用いた。デングウイルス特異的 IgM および IgG 抗体価の測定は、IgM capture ELISA (Focus) および IgG Indirect ELISA (Panbio) を用いて行った。IgG 抗体検出には市販の抗 monkey IgG POD conjugated 抗体 (Capple) を使用し、反応時間を変更して行った。また、体温変動及び活動量の変化はテレメトリーシステムを用いて検索した。

3. 免疫学的解析

DENV 2 型 (DHF0663 株) を、コモンマーモセット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 1, 3, 7, 14, 21, 28 日にそれぞれ採血し、各種 CD マーカーに対する蛍光標識モノクローナル抗体にて染色後、FACS CantoIIにて解析を行なった。

4. 病理学的検策：

DENV に対する免疫染色の一次抗体として、抗 DENV マウスモノクローナル抗体 (6B6C および 12D11/7E8) 2 種、DENV 2 接種後の約 1 年間の間に再度 DENV2 とその不活化抗原が接種されたコモンマーモセット由来の抗血清、ならびに DENV2 の接種後の約 1 年間の間に DENV3 と DENV4 が再接種されたコモ

ンマーモセット由来の抗血清を用いた。マウスモノクローナル抗体については HRP 標識抗マウスグロブリン抗体を反応させ DAB で発色した。コモンマーモセット血清はグロブリンを精製、HRP を直接標識する処置を行った。この精製血清を DAB で発色した。

(倫理面への配慮)

本研究は、国立感染症研究所および医薬基盤研究所の動物実験委員会の審査において承認を受け、医薬基盤研究所筑波霊長類医科学研究センター内の感染症実験施設内で実施した。

C. 研究結果

1. ウイルス接種量の検討

マーモセット 6 頭を 3 群に分け、各 2 頭に 1.8×10^5 pfu、 1.8×10^4 pfu、 1.8×10^3 pfu の DHF0663 株を接種した。接種個体 6 頭全ての血清において接種後 2、4、7 日目の血中よりウイルス RNA が検出された。ウイルス RNA 量のピークは全ての個体で接種後 4 日目に認められた。4 日目のウイルス RNA 量は 10^5 pfu 接種群では、平均 1.6×10^6 copies/ml、 10^4 pfu 接種群では 1.5×10^4 copies/ml、 10^3 pfu 接種群では 5.3×10^3 copies/ml であった。血中 NS1 抗原は 10^5 および 10^4 pfu 接種群では接種後 4、7 日目に認められたが、 10^3 pfu 接種群では接種後 7 日目でのみ認められた。

2. 異なる Dengue ウイルス 2 型株による感染

マーモセット #1, #2 には Jam/77/07 (1.2×10^5 pfu/dose) を、#3, #4 には Mal/77/08 (1.9×10^5 pfu/dose) を、#5, #6

には DHF0663 (1.8×10^5 pfu/dose) を背側皮下に接種した。全ての個体で接種後 4 日目をピークとして 2 日目から 7 日目まで、血中からウイルス RNA が検出された。4 日目のウイルス RNA 量は DHF0663 接種群 (#5, #6) では平均 1.6×10^6 copies/ml、Jam/77/07 接種群 (#1, #2) では 2.4×10^6 copies/ml、Mal/77/08 接種群 (#3, #4) では 8.8×10^6 copies/ml であり、個体差はあるもののほぼ同等のウイルス RNA が認められた。Dengue ウイルスの感染増殖の指標となる NS1 抗原も全ての個体の血中で認められた。さらに、全ての個体で尿中からもウイルス RNA は検出された。

各群の臨床症状を暗期の体温変動を指標として比較した。DHF0663 接種群では 2 個体共に体温上昇が認められ、Jam/77/07 接種群、Mal/77/08 接種群では共に 1 個体 (#2, #3) の体温上昇が観察された。特に #2、#5 においては約 1 週間もの間、体温上昇が確認された。以上の結果から、使用した 3 株はいずれもマーモセットに同様に感染し高いウイルス血症を起こすことが示された。

3. 細胞性免疫応答

マーモセットモデルを用いて DENV 感染初期過程における細胞性免疫担当細胞のダイナミクスについて検討した。DENV 感染後、リンパ球サブセット割合および CD4, CD8 陽性 T 細胞における naïve, central memory, effector memory サブポピュレーションの割合は観察期間中で特に顕著な変動は見られなかった。一方、naïve, effector memory CD8 陽性 T 細胞において Ki-67 陽性率は感染 14 日で増加した。この際、それぞれの時点における Ki-67 標識細胞における蛍光強

度をヒストグラムで解析したところ、naïve, effector memory サブポピュレーション共に非常に強い蛍光シフトが認められた。この結果は、これらの CD8 T 細胞サブポピュレーションが DENV 感染により強く活性化されたことを意味する。

4. 病理学的検策

複数の抗 DENV 抗体を用いた免疫染色を行ったところ、DENV2 が複数回接種されたマーモセットから得られた血清が明瞭な陽性像を示した。脾臓、リンパ節のリンパ系細胞またはマクロファージ、肝臓のクッパー細胞が感染後 5 日で明らかな陽性像を示し、8 日目に最も多数の陽性細胞が認められた。14 日目にはやや減少していた。組織学的な検出系を確立できたことによって、ウイルスの感染動態を組織学的に追うことが可能となった。

D. 考察

これまでの研究からマーモセットがデングウイルス感染症のモデル動物として有用であることが明らかとなった。

デングウイルスに対するワクチンは様々なものが開発段階にあるが、実用化に至ってはいない。その要因の一つとしてワクチンの有効性を評価する動物モデルの欠如が挙げられる。我々のこれまでの研究から新世界ザルに属するコモンマーモセットがワクチン評価系として利用可能であることが明らかになっている。そこで、本年度はワクチン評価系を確立する上で重要であるウイルス接種量について詳細な検討を行った。その結果、 10^3 pfu/dose 接種においてもウイルス血症が認められ、マーモセットがデングウイルスに対して高い感受性を有する

事が明らかになると共に、 10^5 pfu/dose 接種が最もワクチン評価に適した接種量である可能性が示唆された。

また、検討した 2 型デングウイルス野外分離株 3 株はいずれも高いウイルス血症を示した。一方で、臨床症状の指標の一つである体温変動に関しては接種株間で異なる傾向が認められた。今後、デングウイルス感染症の重症化メカニズムについても本モデルを用いてより詳細な検討を進めることが可能となる。

免疫学的解析においては、感染により生じる高いウイルス血症後に、特異抗体のみならず naïve, effector memory CD8 陽性 T 細胞の顕著な活性化が同時に誘導されていることが示された。これらの免疫応答が DENV 増殖制御や病態発現にどのように寄与しているかについても今後の検討が必要である。

今回、DENV2 とその不活化抗原をそれぞれ 2 回接種されたマーモセット由来の抗血清を用いた免疫染色により、DENV2 接種マーモセットの脾臓や肝臓に特異的かつ強い陽性反応を認めた。本血清を用いることにより、今後マーモセットにおけるデングウイルス感染細胞の各臓器における感染動態より詳細な解析が可能となる。

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。また、抗体反応のみでなく、CD8 陽性 T 細胞の活性化が起こっている。また、使用したデングウイルス 2 型の 3 株はいずれも同程度のウイルス血症を示すことから、マーモセットは

特定のウイルス株のみに高い感受性を有するのではないことが示された。

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

大松勉、高崎智彦、片貝祐子、濱野正敬、岩崎優紀、吉田友教、飯島沙幸、中村紳一朗、明里宏文、倉根一郎：マーモセットのデングワクチン評価系としての有用性. 第 57 回日本ウイルス学会学術集会 (東京). 平成 20 年 10 月 26 日

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）

－生物資源・創薬モデル動物研究－

分担研究報告書

マーモセットを用いたデング出血熱発症モデルの構築とウイルス学的検討

－ウイルス株間の病原性の比較－

研究代表者：倉根一郎（国立感染症研究所・ウイルス第一部・部長）

研究協力者：大松 勉（国立感染症研究所・ウイルス第一部・研究官）

研究要旨：

デングウイルスはデング熱を引き起こす病原体で、重症化した場合には出血熱やショック症候群を発症し時に死に至る。しかし、これまでデング出血熱発症モデルは開発されておらず、その発症機序には明らかになっていない。我々の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高い感受性を有する事が明らかになった。そこで、デング出血熱発症モデルを構築するための基礎データとして、2型デングウイルス野外分離株3株に対するマーモセットの感受性について検討を行った。その結果、全ての株で高いウイルス血症が誘導された。一方で、臨床症状の指標の一つである体温変動に関しては接種株間で異なる傾向が認められた。今後、デングウイルス感染症の重症化メカニズムについてより詳細な検討を進める予定である。

A. 研究目的：

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。年々、発生報告数は増加傾向にあり、我が国においても2008年には輸入症例が100例に達した。また、地球温暖化の影響に伴い媒介蚊であるネッタイシマカやヒトスジシマカの生息域の北上も報告されており、感染地域の拡大が懸念されている。

このように節足動物媒介性ウイルス感染

症の中で公衆衛生上重要なものの一つであるにもかかわらず、デングウイルス感染症の重症化の機序は未だ不明である。デングウイルスの感染環は通常ヒト-蚊-ヒトで形成されており、自然界におけるヒト以外の感受性動物はサルのみである。しかし、旧世界ザルにおいてはごく低レベルのウイルス血症を認めるのみで、発熱や出血などの臨床症状を呈さない事から、出血熱発症機序の解明を行う上ではモデルとして不適當であった。

我々のこれまでの研究により、新世界ザルに属するコモンマーモセットがデングウイルス野外分離株の接種により、高いウイルス血症を示し、かつ発熱や血小板減少、肝酵素の上昇等の臨床症状・検査血の変化を呈し、デングウイルス感染モデルとして有用である事が示唆された。そこで、本年度は出血熱発症モデルの構築を目的とし、新たな2型デングウイルス野外分離株2株を用いてマーモセット体内でのウイルス増幅効率と臨床症状について検索し、DHF0663株の場合と比較検討した。

B. 研究方法

接種ウイルスとして、これまで感染モデルの構築に使用してきた2型デングウイルス野外分離株であるDHF0663株に加え、新たにD2/Hu/Jamaica/77/2007NIID (Jam/77/07) 株、D2/Hu/Maldives/77/2008NIID (Mal/77/08) 株を患者血清より分離し使用した。

まず、これら接種ウイルス3株のE領域の遺伝子配列を決定し、データベース上の2型デングウイルスE領域と共に系統学的解析を行った。

接種実験は国内繁殖業者より購入したマーモセット6頭を用いて実施した。腹腔内にテレメーターを挿入したマーモセットに2型デングウイルス3株をそれぞれ2頭ずつ皮下接種し、接種前および接種後2, 4, 7, 14, 21日目に採血を行い、血中ウイルスRNA量、NS1抗原量およびデングウイルス特異的IgMおよびIgG抗体量について検索すると共に、血液検査を実施し血球数及び生化学値について検索した。同時に接

種後14日目まで毎日尿を採取し、尿中からのウイルスRNAの検出も試みた。また、臨床症状の指標として経時的な体温変動についても検索を行った。

血中および尿中ウイルスRNA量は血漿および尿よりRNAを抽出し、TaqMan RT-PCR法を用いてウイルスRNA量を定量した。NS1抗原量の検出にはNS1 antigen capture ELISA (Biorad)を用いた。デングウイルス特異的IgMおよびIgG抗体価の測定は、IgM capture ELISA (Focus) およびIgG Indirect ELISA (Panbio)を用いて行った。IgG抗体検出には市販の抗monkey IgG POD conjugated抗体 (Capple)を使用し、反応時間を変更して行った。また、体温変動及び活動量の変化はテレメトリーシステムを用いて検索した。

本研究は、国立感染症研究所および医薬基盤研究所の動物実験委員会の審査において承認を受け、医薬基盤研究所筑波霊長類医科学研究センター内の感染症実験施設内で実施した。

C. 研究結果

各接種株のE領域全塩基配列を用いた系統解析の結果、Mal/77/08株はDHF0663株に近縁なであった。一方、Jam/77/07株はこれら2株とは系統学的に異なる群に属する事が明らかになった。

ウイルス接種実験は、マーモセットを3群に分けて実施した。#1, #2にはJam/77/07 (1.2×10^5 pfu/dose)を、#3, #4にはMal/77/08 (1.9×10^5 pfu/dose)を、#5, #6にはDHF0663 (1.8×10^5 pfu/dose)を背側皮下に接種した。全ての個体で接種後4日目

をピークとして2日目から7日目まで、血中からウイルスRNAが検出された。4日目のウイルスRNA量はDHF0663接種群(#5, #6)では平均 1.6×10^6 copies/ml、Jam/77/07接種群(#1, #2)では 2.4×10^6 copies/ml、Mal/77/08接種群(#3, #4)では 8.8×10^6 copies/mlであり、個体差はあるもののほぼ同等のウイルスRNAが認められた。デングウイルスの感染増殖の指標となるNS1抗原も全ての個体の血中で認められた。さらに、全ての個体で尿中からもウイルスRNAは検出された。

デングウイルス特異的抗体の検出を試みたところ、全ての個体で接種後7日目の血中より14日目もしくは15日目をピークとするIgMの上昇が認められ、14日目もしくは15日目からIgGが検出された。

各群の臨床症状を暗期の体温変動を指標として比較した。DHF0663接種群では2個体共に体温上昇が認められ、Jam/77/07接種群、Mal/77/08接種群では共に1個体(#2, #3)の体温上昇が観察された。特に#2, #5においては約1週間もの間、体温上昇が確認された。

血球および血液生化学値について検索した結果、血小板減少は6個体中4個体(#2, #3, #5, #6)で認められ、白血球数はJam/77/07接種群の1個体(#1)を除くすべての個体で減少が確認された。デングウイルス感染患者において認められる肝酵素(AST, ALT)値の上昇は、それぞれ#2, #3, #5, #6および#2, #3で認められ、LDHについては#2, #3, #5, #6で上昇が確認された。また、腎酵素であるBUNについては#1, #3, #6で上昇している事が確認された。

D. 考察

本研究においては、デングウイルスに対して高い感受性を有するマーマセットを用いてデング出血熱発症モデルを構築し、出血熱の発症機序を明らかにする事を目的とした。本研究で用いた接種ウイルス3株に関する系統解析の結果、Jam/77/07株は他の2株とは系統的に異なる群に属する事が明らかとなったが、Jam/77/07株を含め今回使用した全ての株がマーマセット体内で高いウイルス血症を引き起こし、ほぼ同レベルのデングウイルス特異的IgMおよびIgG抗体上昇を誘導する事が明らかになった。また、DHF0663株同様に他の2株においても血中においてNS1抗原が検出され、また尿中からはウイルスRNAが検出された。これらの結果はマーマセットがウイルス株によらず、デングウイルスに対して高い感受性を有する動物である可能性を示唆するものである。その一方で、Mal/77/08株は他の2株に比べ4日目のvRNA量が高い傾向が認められたことから、高いウイルス血症を誘導するウイルス側因子が存在する可能性も示唆された。今後、接種ウイルスの全塩基配列を決定し、より高いウイルス血症を誘導するウイルス側因子の同定を試みる予定である。

臨床症状の指標として、体温の上昇について検索を行った結果、各接種株群の中で少なくとも1個体で体温上昇が認められた。特に#2, #5においては約1週間もの間、体温上昇が認められた。また、血液検査の結果として、全ての個体ではないものの血小板減少、白血球減少、肝酵素の上昇が認められ、腎酵素であるBUNの上昇が認められる個体も存在した。既報の霊長類モデル

においては、体温上昇等のデングウイルス感染症に特徴的な臨床症状を呈するという報告はない。この結果は、マーモセットがウイルス接種株によらず臨床症状を呈することを示唆するものであり、マーモセット感染モデルがワクチンや治療薬等の評価モデルとして利用可能であることを支持するものである。一方で、臨床症状の程度には個体差もしくは接種株間で差が認められたことから、重症化に関わる因子については今後より詳細な検討を行っていく必要があると考えられた。

今後は、これら3株の中で最も臨床症状の変化を誘導すると考えられる DHF0663 株を中心に Heterotypic Secondary Inoculation 実験を実施する等、出血熱発症モデルの構築を進めていく。

E. 結論

マーモセットはウイルス株によらず使用した2型デングウイルス3株全てに対して高い感受性を示したことから、マーモセットがデングウイルス感染モデルとして有用である事が示唆された。本モデルを用いて出血熱発症モデルの構築を今後も進めていく。

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

大松勉、高崎智彦、片貝祐子、濱野正敬、岩崎優紀、吉田友教、飯島沙幸、中村紳一朗、明里宏文、倉根一郎：マーモセットのデングワクチン評価系としての有用性. 第57回日本ウイルス学会学術集会（東京）. 平成20年10月26日

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

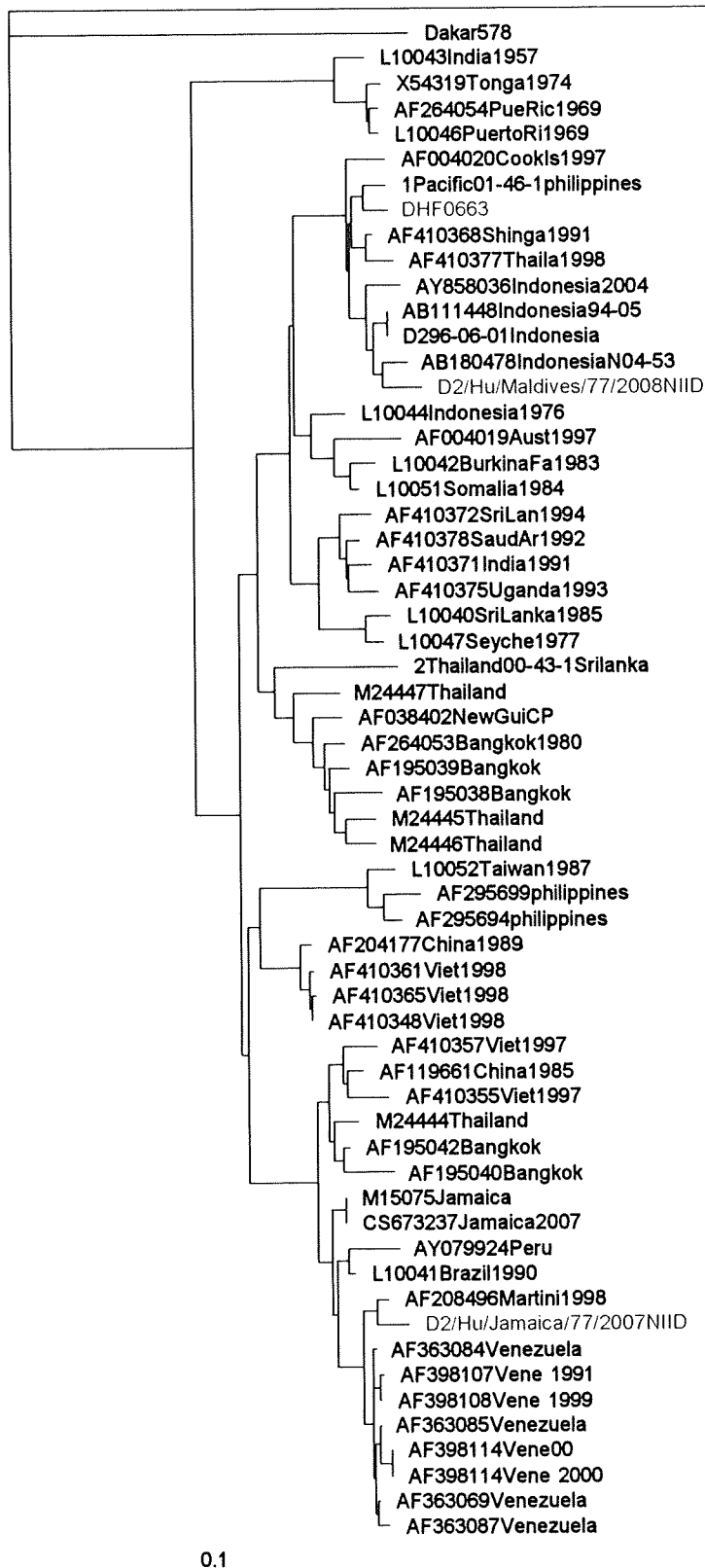


図1. 2型 Dengue ウイルス E 蛋白コード領域の塩基配列を用いた系統解析

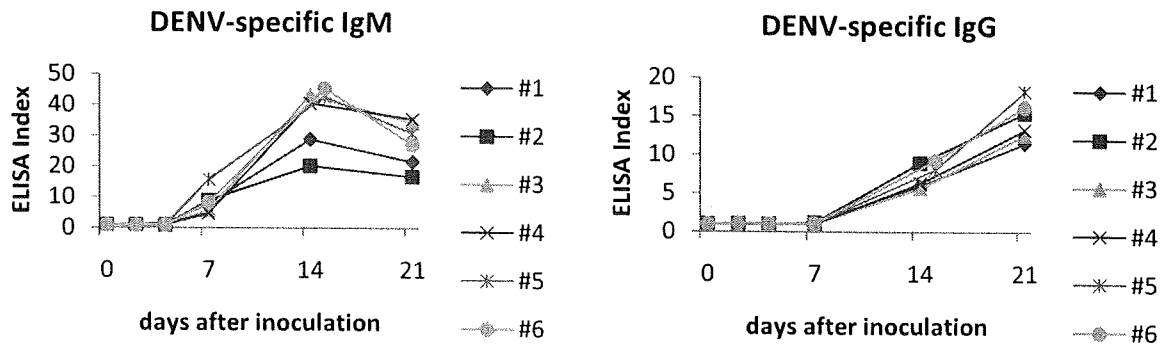


図2. デングウイルス特異的抗体の推移

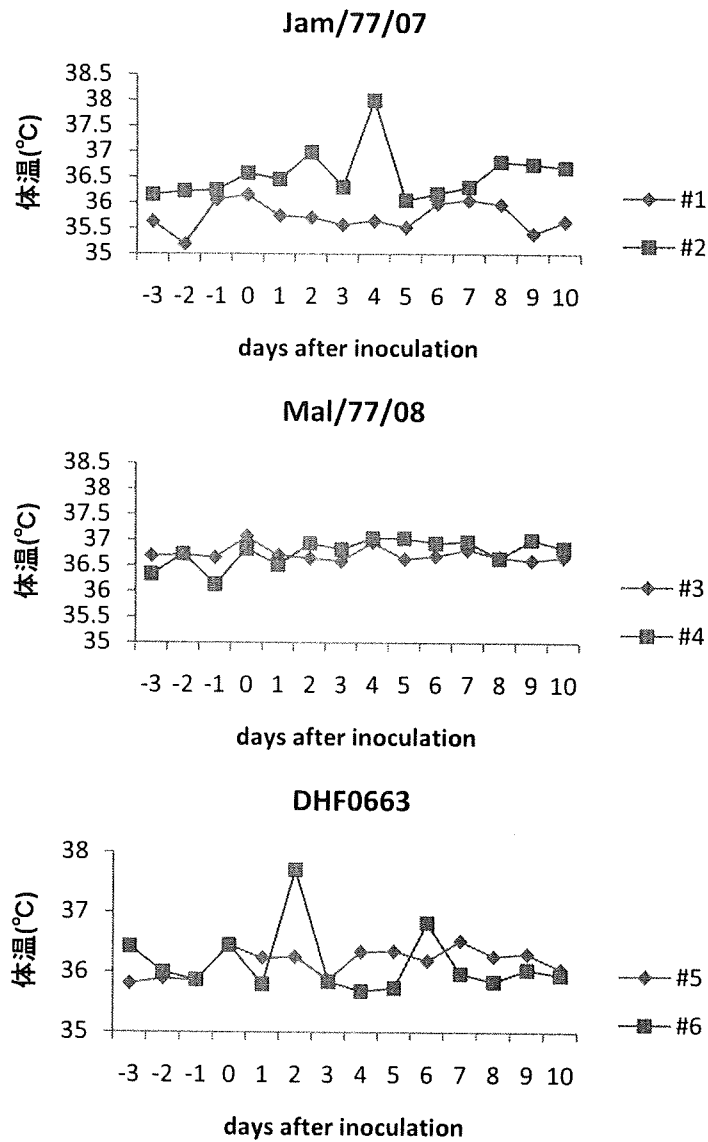


図3. 暗期における体温変動の推移

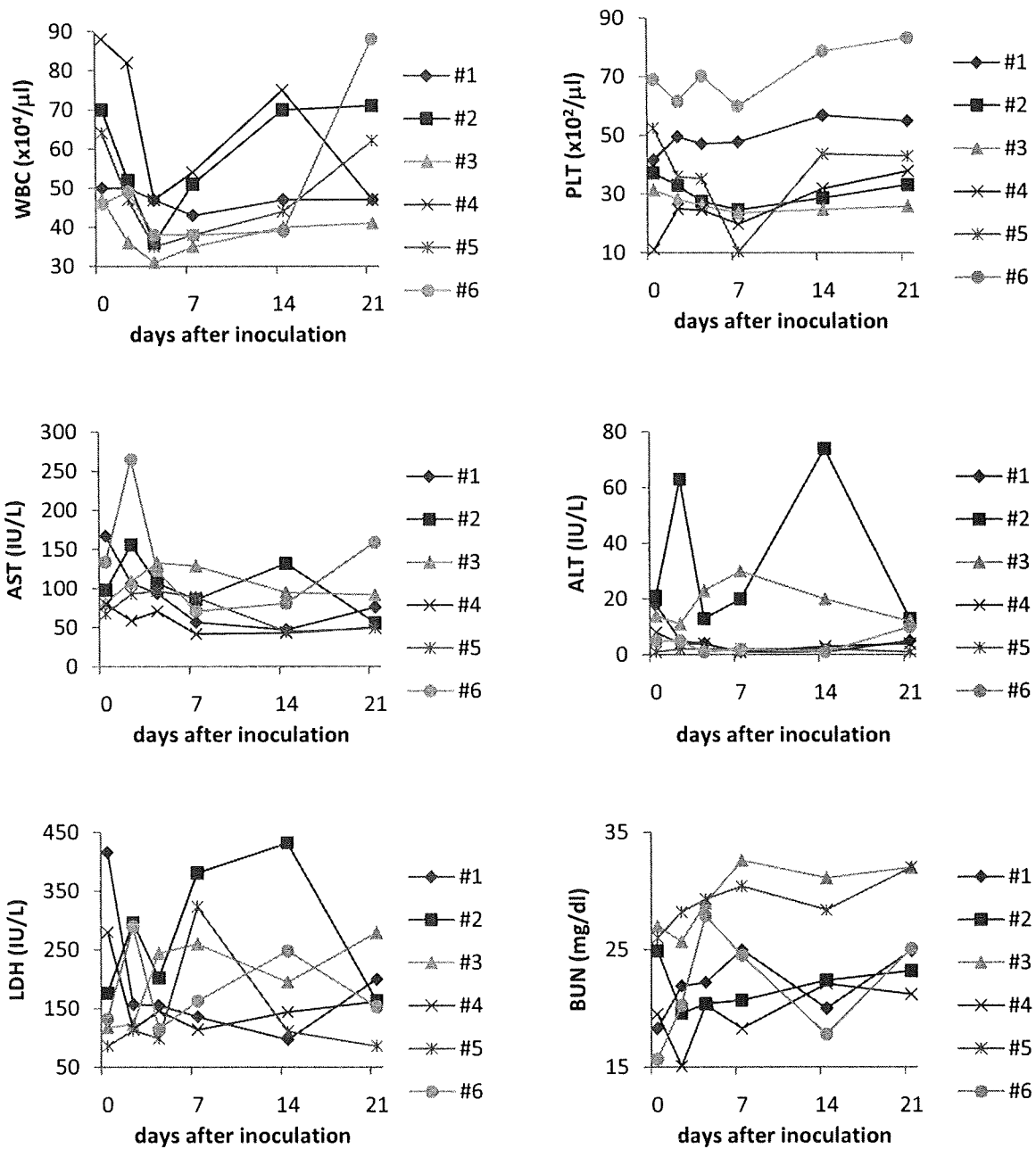


図4. 血球・血液生化学値の推移

表1. 2型デングウイルス接種個体における血中ウイルスRNA量

Animal ID	strain	Inoculation titer (pfu/dose)	Assay	Dengue vRNA copy numbers (copies/ml)						
				0	2	4	7	14	21	
#1	Jam/77/07	1.2x10 ⁵	RNA	-	1.0x10 ⁶	2.8x10 ⁶	4.6x10 ⁴	-	-	-
			NS1	-	-	+	+	-	-	
#2	Jam/77/07	1.2x10 ⁵	RNA	-	8.7x10 ⁵	2.0x10 ⁶	4.9x10 ⁴	-	-	-
			NS1	-	-	+	+	-	-	
#3	Jam/77/07	1.2x10 ⁵	RNA	-	4.8x10 ⁶	9.6x10 ⁶	5.8x10 ³	-	-	-
			NS1	-	-	+	+	-	-	
#4	Mal/77/08	1.9x10 ⁵	RNA	-	2.0x10 ⁶	7.0x10 ⁶	4.7x10 ³	-	-	-
			NS1	-	-	+	+	-	-	
#5	DHF0663	1.8x10 ⁵	RNA	-	3.5x10 ⁴	1.0x10 ⁶	1.1x10 ⁴	-	-	-
			NS1	-	-	+	+	-	-	
#6	DHF0663	1.8x10 ⁵	RNA	-	1.2x10 ⁵	2.2x10 ⁶	1.5x10 ⁴	-	-	-
			NS1	-	-	+	+	-	-	

表2. 2型デングウイルス接種個体における尿中ウイルスRNA量

Animal ID	strain	Inoculation titer (pfu/dose)	Assay	Dengue vRNA copy numbers (copies/ml)														
				1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	
#1	Jam/77/07	1.2x10 ⁵	RNA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
			NS1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
#2	Jam/77/07	1.2x10 ⁵	RNA	-	-	-	6.7x10 ³	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4.2x10 ⁵
			NS1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
#3	Mal/77/08	1.9x10 ⁵	RNA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	7.8x10 ⁵
			NS1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
#4	Mal/77/08	1.9x10 ⁵	RNA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	8.1x10 ⁵
			NS1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
#5	DHF0663	1.8x10 ⁵	RNA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1.8x10 ³
			NS1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
#6	DHF0663	1.8x10 ⁵	RNA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2.4x10 ³
			NS1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Ⅱ. 分担研究報告書

分担研究報告書

マーモセットを用いたデングワクチン評価系の構築とウイルス学的検討

－ウイルス接種量の検討と感受性の評価－

研究分担者：高崎智彦（国立感染症研究所・ウイルス第一部・室長）

研究協力者：大松 勉（国立感染症研究所・ウイルス第一部・研究官）

研究要旨：

デングウイルスに対するワクチンは様々なものが開発段階にあるが、実用化に至っていない。その要因の一つとしてワクチンの有効性を評価する動物モデルの欠如が挙げられる。我々のこれまでの研究から新世界ザルに属するコモンマーモセットがワクチン評価系として利用可能であることが明らかになっている。そこで、本年度はワクチン評価系を確立する上で重要であるウイルス接種量について詳細な検討を行った。その結果、 10^3 pfu/dose 接種においてもウイルス血症が認められ、マーモセットがデングウイルスに対して高い感受性を有する事が明らかになると共に、 10^5 pfu/dose 接種が最もワクチン評価に適した接種量である可能性が示唆された。

A. 研究目的

デングウイルスはデング熱・デング出血熱を引き起こす蚊媒介性ウイルスであり、熱帯・亜熱帯地方を中心に年間数千万人がデング熱を罹患し、数十万人がデング出血熱を発症すると推計されている。患者数は年々増加傾向にあり、我が国においても輸入症例として 2008 年には 100 例を超える患者が報告されている。しかし、有効な治療薬はなく、開発途上にあるワクチンの実用化が急務となっている。治療薬やワクチンの開発においては適切な動物モデルが必須であり、様々な動物種を用いたモデルの

構築が試みられてきたが、正常動物を用いた評価モデルの確立には至っていない。自然界においてヒト以外の感受性動物はサルのみであるが、マカク属などの旧世界ザルではウイルス血症は低くデングウイルス感染症で認められる臨床症状も示さないため、モデル動物としては不十分であった。

我々のこれまでの研究から、新世界ザルに属するコモンマーモセットが同一ウイルスの再感染に対しては感染防御が成立し、マーモセットを用いた感染モデルがワクチン評価モデルとしても有用である事が示された。そこで、本年度はワクチン評価系の

確立を目指し、ワクチン評価を行う上での指摘接種量の検討を行うと共に、マーモセットのデングウイルス感受性について検討を行った。

B. 研究方法

接種ウイルスとして、2型デングウイルス野外分離株 DHF0663 株を使用した。

実験には国内繁殖業社より購入し、医薬基盤研究所筑波霊長類医科学研究センターにおいて飼育しているマーモセット 6 頭を用いて行った。腹腔内にテレメーターを挿入したマーモセットに DHF0663 株を 1.8×10^5 pfu/dose から 1.8×10^3 pfu/dose まで 10 倍段階希釈したウイルスをそれぞれ各 2 頭ずつ背側皮下に接種し、接種前および接種後 2、4、7、14、21 日目に採血を行い、血中ウイルス RNA 量、NS1 抗原量、デングウイルス特異的 IgM および IgG 抗体量について検索すると共に、血液検査を実施し、血球数および生化学値についても検索を行った。同時に接種後 14 日目まで毎日尿を採取し、尿中からのウイルス RNA 検出も試みた。また、テレメーターを利用して経時的に体温変動についても検索を行った。

血中および尿中ウイルス RNA 量は血漿および尿より High pure viral RNA kit (Roche) を用いて RNA を抽出し、TaqMan RT-PCR 法を用いてウイルス RNA 量の定量を行った。NS1 抗原量の検出には NS1 antigen capture ELISA (Biorad) を用いた。デングウイルス特異的 IgM および IgG 抗体価の測定は、IgM capture ELISA (Focus) および IgG Indirect ELISA (Panbio) を用いて行った。IgG 抗体検出

には市販の抗 monkey IgG POD conjugated 抗体 (Capple) を使用し、反応時間を変更して行った。また、体温変動及び活動量の変化はテレメトリーシステムを用いて検索した。

本研究は、国立感染症研究所および医薬基盤研究所の動物実験委員会の審査において承認を受け、医薬基盤研究所筑波霊長類医科学研究センター内の感染症実験施設内で実施した。

C. 研究結果

マーモセット 6 頭を 3 群に分け、#1, #2 には 1.8×10^5 pfu/dose を、#3, #4 には 1.8×10^4 pfu/dose を、#5, #6 については 1.8×10^3 pfu/dose の DHF0663 株を接種した。接種個体 6 頭全ての血清において接種後 2、4、7 日目の血中よりウイルス RNA が検出された。ウイルス RNA 量のピークは全ての個体で接種後 4 日目に認められた。4 日目のウイルス RNA 量は 10^5 pfu 接種群では、平均 1.6×10^6 copies/ml、 10^4 pfu 接種群では 1.5×10^4 copies/ml、 10^3 pfu 接種群では 5.3×10^3 copies/ml であった。血中 NS1 抗原は 10^5 および 10^4 pfu 接種群では接種後 4、7 日目に認められたが、 10^3 pfu 接種群では接種後 7 日目でのみ認められた。また、 10^5 pfu 接種群では全 2 個体の尿中からウイルス RNA が検出されたが、 10^4 pfu 接種群では 2 個体中 1 個体 (#4) のみで認められ、 10^3 pfu 接種群では 2 個体共に尿中からはウイルス RNA が検出されなかった。

デングウイルス特異的抗体の検出を試みた結果、全ての個体で接種後 7 日目から、14 日目もしくは 15 日目をピークとする IgM 抗体の上昇が認められた。また、IgG