

200911003B

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～平成21年度 総合研究報告書

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19年度～平成21年度 総合研究報告書

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. 総合研究報告

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. 分担研究総合報告

マーマセツトを用いたデングワクチン評価系の構築と実用への整備・・・・・・・・・・ 9

研究分担者：高崎智彦（国立感染症研究所・ウイルス第一部）

デング実験感染霊長類モデルの臨床的、病理学的検討・・・・・・・・・・ 13

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：病理組織学的検索と病態解析・・・・・・・・・・ 17

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）

総合研究報告書

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：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。

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。同一ウイルスの再感染に対しては完全に防御が成立し、本モデルがワクチン評価系として有用であることが確認された。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が、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。

本マーモセットモデルを用いて感染初期過程における細胞性免疫の解析を行った。デングウイルス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、これらがデングウイルス増殖制御に寄与している可能性が示唆された。

デングウイルスに感染したマーモセットの病理学的解析においては、腎臓に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認められた。間質に出現する細胞は T および B リンパ球、マクロファージなどと多彩であった。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においてデング抗原が認められた。さらに間質性腎炎に出現するリンパ球の一部も抗原陽性であった。以上より、マーモセットがデングウイルスに高い感受性を有し、ワクチン開発等に動物モデルとして使用できることが示された。さらに、デングウイルス感染における病態を、免疫学、病理学的にさらに詳細に解析することも可能となった。

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

としては不適當である。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

1) デングウイルス 1-4 型による感染：

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。

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 日目で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 Dengue 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。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。

2) 同一血清型 Dengue ウイルスに対する防御:

マーモセット 4 個体に対し Dengue 2 型ウイルスを接種し、接種前および接種後 3, 7, 14, 21 日目に採血を行い、血中ウイルス量、ウイルス抗原量、抗体価の測定を行った。同時に血液生化学値についても検討した。さらに接種後 33 週目に Dengue ウイルス 2 型を再接種し、接種前および接種後 2, 4, 7, 14, 21 日後に採血を行い血中ウイルス量、ウイルス抗原量および抗体価について検索し、同一ウイルスの再感染に対するウイルス防御能について検索を行った。

3) 異なる Dengue ウイルス 2 型株による感染:

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 Dengue 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 Dengue 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。Dengue 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。

4) タマリンへの Dengue ウイルス感染:

サル攻撃接種用ウイルスとして、臨床分離株 Dengue ウイルス 2 型 (DHF0663 株) を用いた。Dengue ウイルス 2 型 10^7 PFU/ml を、アカタマリン 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。

4. 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にて解析を行った。

5. 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、DENV2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. マーモセットのデングウイルス感染

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:

マーモセット各一頭にデングウイルス1-4型を接種した。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:

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 9.9×10^7 copies/ml、最も高い個体で 3.0×10^8 copies/mlであった。ウイルス血症は接種後8日目に個体では、 2.2×10^6 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、 2.7×10^5 copies/mlのウイルスRNAであり、10日目に 8.4×10^7 copies/mlと最高値を示し、14日目でも 8.2×10^6 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) 同一血清型のデングウイルスに対する防御:

デング 2 型ウイルスの再感染では、すべての個体に 1.8×10^5 pfu/animal のウイルスを接種したが、全ての個体のいずれの時期においても血中および尿中からウイルス RNA は検出されなかった。同様に、NS1 抗原に関しても全ての個体でまったく検出されなかった。

4) ウイルス接種量の検討:

マーマセツト 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。

5) 異なるデングウイルス 2 型株による感染:

マーマセツト #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。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。

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 株はいずれもマーマセツ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。

2. タマリンへのデングウイルス感染

アカタテタマリンにも同様にデングウイルス 2 型 (DHF0663 株) を接種しウイルス増殖経過を解析した。コモンマーマセツトにおける血漿中ウイルス RNA 量にくらべ、アカタテタマリンでは $1/10 \sim 1/100$ 程度であった。抗デング抗体価について測定したところ、IgM 抗体価は、Day 3 以降から上昇がみられた。IgG 抗体価についても Day 3 以降から上昇していた。

3. マーマセツトの細胞性免疫応答

マーマセツトモデルを用いて 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. マーモセットの病理学的検策

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

本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示された。

まず、本研究においては、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。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。

さらに、マーモセットのデングワクチン評価系として有用性について評価を行った。デングウイルス感染マーモセットに対し同一ウイルスの再感染実験を行った結果、感染が成立せず同一ウイルスの再感染に対しては防御が誘導されることが明らかになった。また、初感染においては白血球減少や肝および腎酵素の上昇などの検査所見が確認されたが再感染ではそれらが確認されなかった。従って、初感染により誘導された中和抗体がデングウイルス感染の防御に有効であることが示された。以上の結果はマーモセットがワクチン評価系として有用

であることを示すものである。

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も検討を行った。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。複数のデング 2 型ウイルス株を用いて感染実験を行ったが、用いた 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。

これまでコモンマーモセット等新世界ザルのリンパ球サブセットに関しては、その解析がほとんど進んでいないのが実情であり、マルチカラーフローサイトメトリーによる詳細な解析はほとんど報告がない。本研究の成果により、マーモセットにおける免疫担当細胞の機能的動態を経時的に解析可能となったことは意義深い。特に、中和抗体とともに CD8 T 細胞を主体とする細胞性免疫誘導がその制御に関わっている可能性も示唆された。今後は、今回確立された技術を基盤として、さらに活性化 CD8 T 細胞の役割を解析する必要がある。

さらに、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った。

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。また、デング熱患者でみられる症状の一部も発症する。同一血清型のデングウイルスの再感染に対しては完全に防御が成立する。従って、マーモセットのデングウイルス感染モデルはワクチンや抗デングウイルス剤評価系として有用である。

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

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、倉根一郎マーモセットを用いたデング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

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 21 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

Ⅱ. 分担研究総合報告書

分担研究総合報告書

マーモセットを用いたデングワクチン評価系の構築と実用への整備

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生ワクチンを中心に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実用としてのモデル動物の欠如が挙げられる。これまで霊長類を中心としてさまざま動物種を用いた評価は行われてきたものの利用可能なモデル動物はなく、カニクイザルを含めた旧世界ザルは感受性が低く症状も呈さなかった。我々はこれまでに、新世界ザルの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示すことを明らかにしてきた。本研究はマーモセットのデングワクチン評価系としての有用性について検討し、実用のための基盤的データ収集を行った。その結果、同一ウイルスの再感染に対しては完全に防御が成立し、本モデルがワクチン評価系として有用であり、ワクチンの実用のための霊長類モデルとすることが可能であると確認された。また、ワクチンの防御効果を評価する上で重要な攻撃ウイルス量は 10^5 pfu/ml であると結論した。

A. 研究目的：

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数千万人が罹患し、数十万人がデング出血熱を発症するという節足動物媒介性ウイルス感染症である。我が国においても輸入症例として2008年は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、ワクチンは開発途上にあるためその実用化は急務となっている。治療薬やワクチンの開

発には適切なモデル動物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十分な感受性を示す自然動物種はなく、特にマカク属のサルではウイルス血症は低く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。本研究においては、これまでマーモセット属コモンマーモセットが1～4型すべてのデングウイルスに対して感受性を有することを明らかにしてきた。マーモセットを用いたワクチン評価系

モデルの確立を目的として、ホモのウイルス型再感染実験を行い評価モデルとしてのワクチンの防御効果を判定できることを明らかにし、ワクチン評価を行う上での攻撃試験時の至適ウイルス接種量の検討を行った。

B. 研究方法

防御に関する検討

マーモセット 4 個体に対し Dengue ウイルス 2 型を接種し、接種前および接種後 3, 7, 14, 21 日目に採血を行い、血中ウイルス量、ウイルス抗原量、抗体価の測定を行った。同時に血液生化学値についても検討した。さらに接種後 33 週目に Dengue ウイルス 2 型を再接種し、接種前および接種後 2, 4, 7, 14, 21 日後に採血を行い血中ウイルス量、ウイルス抗原量および抗体価について検索し、同型ウイルスの再感染に対するウイルス防御能について検討した。

チャレンジドーズの検討

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 (Dengue ウイルス非構造蛋白) 抗原量、Dengue ウイルス特異的 IgM および IgG 抗体を測定すると共に、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ウイルス RNA を抽出し、TaqMan RT-PCR 法によりウイルス RNA 量の定量を行った。NS1 抗原量の検出には NS1 antigen capture ELISA (biorad 社) を用いた。Dengue 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 (Cappel) 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、国立感染症研究所の動物実験委員会の審査を受け、その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. 結果

Dengue ウイルス 2 型の初感染においては 4 個体全てにおいて 6×10^6 copies/ml 以上のウイルス RNA が接種後 3 日目をピークとして検出された。また、4 個体中 3 個体の尿中からウイルス RNA が検出され、個体によっては接種 14 日目の尿中からもウイルス RNA が検出された。NS1 抗原は体内で Dengue ウイルスが感染・増殖した場合に感染細胞から放出される非構造蛋白質であり、その存在は体内でのウイルス増殖の指標ともなり得るものである。 10^7 pfu/animal 接種群では接種 3 日目をピークとして 7 日目まで NS1 抗原が検出されていたが、 10^5 pfu/animal 接種群では 3 日目から検出され 7 日目をピークとして検出され

た。DENV 特異的 IgM 抗体については接種 7 日目から 14 日目をピークとして検出され、抗 Dengue ウイルス IgG 抗体は接種後 14 日目から陽性となった。さらに血液検査の結果から、すべての個体で白血球減少が確認され、肝酵素、腎酵素の上昇などが確認される個体が見られた。

Dengue ウイルス 2 型の再感染では、すべての個体に 1.8×10^5 pfu/animal のウイルスを接種したが、全ての個体のいずれの時期においても血中および尿中からウイルス RNA は検出されなかった。同様に、NS1 抗原に関しても全ての個体でまったく検出されなかった。

チャレンジドーズの決定

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。

D. 考察

本研究では、Dengue ウイルスに高い感受性を示すマーモセットの Dengue ワクチン評価系として有用性について検討した。これまでのワクチン評価のための動物モデルに

関する研究は主にカニクイザル等の旧世界ザルを用いて行われていたが、その感受性は低くまた特に症状も示さないためモデルとしての利用範囲は限られていた。本実験において Dengue ウイルス感染マーモセットに対し同一ウイルスの再感染実験を行った結果、感染が成立せず同一ウイルスの再感染に対しては防御が誘導されることが明らかになった。また、初感染においては白血球減少や肝および腎酵素の上昇などの検査所見が確認されたが再感染ではそれらが確認されなかった。従って、初感染により誘導された中和抗体が Dengue ウイルス感染の防御に有効であることが示された。以上の結果は、Dengue ウイルス感染に対する防御に中和抗体が有効であることを改めて示すものであり、またマーモセットがワクチン評価系として有用であることを示すものである。

また、攻撃ウイルス量としては 10^3 pfu という低用量接種においてもマーモセット体内で感染が成立しウイルスが増殖するという事が確認された。しかし、ウイルス接種により誘導された臨床症状として、体温変動、血球・生化学値の変化について検索を行った。 10^5 pfu 接種においては、発熱、血小板減少、白血球減少、肝酵素値の上昇など Dengue ウイルス感染症で特異的に認められる変化が観察されたが、 10^4 pfu 接種群ではその変化の程度が減少し、 10^3 pfu 接種群においてはウイルス血症が認められたが、臨床症状を呈さない個体も認められた。現在、開発途上にあるワクチンの一部は子供を対象とした臨床段階へと進んでいるが、その安全性や有効性の評価には適切な実験動物を用いた評価が不可欠である。マーモ

セットを用いたデングウイルス評価系は今後のワクチン開発および実用化を進展させるものとなるを考える。

E. 結論

本研究において、デングウイルスに対する中和抗体が感染防御に対して有効であることを改めて示すと共に、マームセット-デングウイルス感染モデルがワクチン評価系として有効であることが明らかになった。また、防御効果の評価に関しては 10^3 pfu という低用量接種でも可能であることが確認できたが、臨床的評価から 10^5 pfu/ml が適当であると考えられた。

F. 健康危機管理情報

特になし

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。マームセットを用いたデング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

Fujii Y, Kitaura K, Matsutani T, Takasaki T, Ogata M, Suzuki S, Itoh T, Kutane I,

Suzuki R. コモンマームセット T 細胞受容体 α 鎖および β 鎖配列の網羅的解析. 第39回日本免疫学会総会・学術集会. 2009年12月2-4日(大阪)

2. 論文発表

Meng Ling Moi, Lim CK, Takasaki T, Kurane I. Involvement of the Fc γ receptor IIA cytoplasmic domain in antibody enhancement of dengue virus infection. *J Gen Virol.* 91:103-11. 2010.

Meng Ling Moi, Lim CK, Kotaki A, Takasaki T, Kurane I. Development of an antibody-dependent enhancement assay for dengue virus using stable BHK-21 cell lines expressing Fc γ RIIA. *J Virol Methods.* 163(2):205-209.2010

Moi ML, Lim CK, Kotaki A, Takasaki T, Kurane I. Discrepancy in Neutralizing Antibody Titers between Plaque Reduction Neutralizing Tests Using Fc $\{\gamma\}$ R-negative and Fc $\{\gamma\}$ R-expressing BHK-21 cells. *Clin Vaccine Immunol.* 17(3):402-7.2010

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：デングウイルス検査方法及びモデル動物(特願2008-35178)

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）
総合研究報告書

デング実験感染霊長類モデルの臨床的、病理学的検討

研究分担者 明里宏文 京都大学霊長類研究所・教授

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、新たな霊長類モデル開発を試みた。その結果、コモンマーモセットおよびタマリン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。さらに本モデルを用いて 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。その結果、DENV 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、これらが DENV 増殖制御に寄与していることが示唆された。本結果は DENV 病態解明およびワクチン開発評価研究において重要な知見と考えられた。

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、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、今回新世界ザルであるマーモセット及びアカタマリンへのデングウイルス接種実験を行なった。さらに当霊長類モデルを用いてこれまで臨床分野で解析があまり進んでいない DENV 感染初期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 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およびアカタマリンを用い、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。接種後経時的に採血を行なった。また尿を可能な範囲で採取し血液と共にウイルス定量を行なった。血漿、尿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。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。

(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

(1) コモンマーモセットへの Dengue ウイルス攻撃接種後、血中ウイルス RNA 値を経時的に測定したところ、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 が感染 3–7 日をピークに検出された。また血中におけるウイルス抗原である NS1 蛋白もウイルス RNA と相関して増加していることが確認された。抗 Dengue 抗体価については 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。上記の経過観察の過程で、Dengue ウイルス接種ザルの 1 頭において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、尿中に約 2 週間にわたって持続的なウイルス排出を確認した。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。

(2) アカタマリンへの Dengue ウイルス攻撃接種後、血中ウイルス RNA 値を経時的に測定したところ、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。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。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。感染 1 週後、#11、#17 個体の剖検を行ない、採取した組織サンプル中におけるウイルス RNA を定量したところ、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。

(3) 正常コモンマーモセットのリンパ球サブセットに関して解析を行なった。ヒトやアカゲザル等と同様に、リンパ球は CD3 陽性 T 細胞および CD20 陽性 B 細胞に分画され、この T 細胞サブセットはさらに CD4 および CD8 陽性 T 細胞サブセットに分画されることを確認した。次に、6 種類の異なる蛍光標識モノクローナル抗体を用いてマルチカラー解析を行なった。その結果、(i) 上記同様に CD3 陽性 T 細胞を CD4 および CD8 陽性 T 細胞サブセットに分画、(ii) CD62L および CD95 特異的抗体により CD4 および CD8 陽性 T 細胞をそれぞれ naïve, central memory, effector memory サブポピュレーションに分画、さらに (ii) Ki-67 抗体を用いて上記サブポピュレーションに関して活性化 (分裂増殖期にある) 細胞率を定量することが可能であることを確認した。

そこで、確立したマーカー解析手法を用いて DENV 感染マーモセットにおける経時的な変動を

解析した。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。ところが、naïve, effector memory CD8 陽性 T 細胞において Ki-67 陽性率は感染 14 日で劇的な増加を示すことが明らかとなった。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。このことは、これらの CD8 T 細胞サブポピュレーションが DENV 感染により強い活性化誘導を起こしたことを意味する。

最後に、上述のリンパ球活性化とウイルス動態および抗体価との相関関係について検討を行った。血中 DENV NS1 抗原量および特異抗体 (IgM, IgG) の推移を見ると、感染 7 日後で NS1 抗原量がピークとなり、その後低下するとともに感染 14 日後で IgM 抗体価がピークとなった。また、それに引き続き IgG 抗体価が上昇した。以上のことから、DENV の強い増殖が CD8 T 細胞を中心とする細胞性免疫および液性免疫を同時に誘導し、これらが DENV 増殖制御に寄与していることが示唆された。

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及びアカテタマリンにおけるデングウイルス感受性について検討を行った。その結果、我々の予想を上回り、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。さらに本結果から、デングウイルスの中で 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。

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デング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。

これまでコモンマーモセット等新世界ザルのリンパ球サブセットに関しては、その解析がほとんど進んでいないのが実情であり、まして本研究成果のようなマルチカラーフローサイトメトリーによる詳細な解析は全くと言って良いほど報告がない。他方、DENV 感染者における免疫担当細胞の変動を経時的に解析した知見はほとんど知られていない。今回の研究成果により、DENV 感染時における免疫担当細胞の機能的動態を経時的に解析可能となったことは意義深い。特に、以前の研究では、中和抗体が DENV 感染制御に寄与する主要な免疫応答であるものと考えられてきたが、本結果から中和抗体および CD8 T 細胞を主体とする細胞性免疫誘導がその制御に関わっていることが示唆された。今後は、今回確立された技術を基盤として、さらに活性化 CD8 T 細胞の DENV 制御における機能的意義を実証していきたい。

ところで、DENV 感染におけるデング出血熱といった重篤化のメカニズムには不明な点が多いが、単球・マクロファージや NK 細胞といった自然免疫担当細胞からのさまざまなサイトカイン産生が寄与しているものと考えられている。他方、一般的にウイルス制御には自然免疫が重要な役割を担っているとされているが、DENV 感染制御における自然免疫の役割はよく判っていない。今後は、本霊長類モデルを用いて DENV 感染における自然免疫の意義を明らかにしていきたい。

世界的に非常に多くの DENV 感染者およびデング熱・デング出血熱罹患患者がいるにも関わらず、DENV 関連疾患への有効な抗ウイルス薬、治療薬は