

未開発である。一方 DENV 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 DENV 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 DENV 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。こうしたことを踏まえ、我々が新たに開発した新世界ザル DENV 感染モデルにより液性・細胞性免疫誘導の意義を詳細に解明することによって、DENV ワクチン開発の最適化、迅速化への貢献が期待される。

#### 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およびアカ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。またアカ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。

本霊長類モデルを用いて 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。

#### F. 健康危機管理情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 学会発表

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

マーモセットの抗デングウイルスワクチン評価系としての有用性

第 57 回ウイルス学会（東京）平成 21 年 10 月 25-27 日

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

##### 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：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）  
分担研究総合報告書

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：  
病理組織学的検索と病態解析

研究分担者 中村 紳一郎 滋賀医科大学准教授

研究要旨 新世界ザルに属するコモンマーモセットはデング熱ウイルス（DENV）2 に対する感受性を持ち、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現れた。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。種々の抗体を用いて、DENV の組織学的な検出を試みた中、DENV2 を複数回接種されたマーモセットから得られた抗血清が明瞭に DENV を検出した。この抗血清は脾臓、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陽性を示し、さらに間質性腎炎に出現するリンパ球の一部も陽性だった。一方、他の新世界ザルのアカタマリンでは病変が見られなかった。デング熱ウイルスに対するコモンマーモセットの病態が明らかにされ、かつウイルスを組織学的に追うことが可能なツールが開発できた。

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、骨髄低形成などが見られている。ウイルスのターゲットは主に免疫系ならびに血管系の細胞と考えられている。

デング熱に対する適切なモデル動物は知られておらず、この研究では主に新世界ザルを対象にモデル動物の確立を目指した。その中でこの分担研究は、病理組織学的側面からの検討を担い、1) DENV の 1~4 の血清型のうち、いずれがコモンマーモセ

ットに対して病原性を示すのか、病変はどのような組織型を示すか、2) 病原性を示した DENV2 の挙動と病変の推移が、経時的にどのように変化するのか、3) 他の手に入り得る新世界ザル、アカタマリンに対する病原性はいかなるものか、などについて検討した。

さらに DENV は免疫組織化学に適応する、良好な抗体が少ない。たとえ症状や病態を示したとしても、組織中での DENV の挙動を追うことができることで、はじめてその病理発生の詳細も明らかにすることができる。そのために、有効な免疫組織化学によるウイルス抗原の検出系の確立を目指した。

## B.研究方法

実験 1: 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。

実験 3: 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。

実験 4: メス・アカタマリン 2 例に DENV2 を感染させ、7 日後に病理解剖を行った。

組織学的解析: 上記実験で病理解剖に付された動物の脾臓、リンパ節、肝臓、腎臓を採取した。それぞれの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し、パラフィン包埋材料を作製した。さらに DENV2 が播種された vero 細胞を回収し、遠心後にペレットを作製、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。

これらの 4 $\mu$ m の切片を作製し、HE 染色を施し、未染色切片を免疫染色に供した。免疫組織学的解析; DENV に対する免疫染色の一次抗体として、マウスないしはウサギ由来の D1-4(D2)-M、D1-4(D2)-R、D1-4、D2(3H5.1)、(D1-4G2)、D1-D4(2H2)、3B、D1-11、SQ93-2239、6B6C および 12D11/7E8 の 11 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 (#17)、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 (#18) を用いた。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。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) を用いた。すべての切片は DAB で発色した。

## C.研究結果

実験 1 では肉眼的に 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、間質性腎炎の像を呈していた。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。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 では 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った。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。

実験 3 で、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。

実験 4 で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髓外造血が認められた。また一例は脾臓で白脾髓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。

DENV に対する免疫染色で、DENV2 が播種された vero 細胞に対しては、D1-4、SQ93-2239 以外のすべての抗体が陽性を示した。

しかし DENV2 が接種されたマーモセットに対して有効だったのは 6B6C と #17 だ

った。D1-4(D2)-M、D2(3H5.1)、D1-4G2、D1-D4(2H2)、12D11/7E8 はいずれも腎臓の近位尿細管上皮細胞と肝臓の胆管上皮細胞の細胞質に顆粒状の陽性像を認めたが、これらは非特異反応だった。

6B6C は 14 日目の腎臓間質の一部リンパ球が陽性だったが、他の臓器に陽性像は見られなかった。

#17 抗体が最も適切な陽性反応を示し、脾臓では 5 日目から陽性細胞が出現し、8 日目に最も多くなり、14 日では陽性細胞は減少、5 日目とほぼ同等となった。陽性細胞は主に白脾髓の辺縁帯のリンパ球、樹状細胞ないしはマクロファージ系の細胞で、8 日目には胚中心のリンパ球にも陽性像が見られた。

リンパ節では、14 日目に皮質の辺縁帯に相当する部分のリンパ球、樹状細胞ないしはマクロファージ系の細胞が陽性となったが、それ以前の時期に陽性細胞は見られなかった。

肝臓では、3 日目からクッパー細胞に陽性像が見られ、5、8 日目と陽性細胞は増加し、14 日になるとやや減少した。

腎臓では 8 および 14 日目の炎症巣内のリンパ球およびマクロファージに陽性像が見られた。

#### D. 考察

マーモセットでは、主にリンパ系臓器やクッパー細胞に親和性があり、この点はヒトで知られている感染細胞と一致していた。しかし血管系細胞への親和性のないことから、血管での破壊性変化が起こらず、ヒトで見られるような出血性の変化に至らなかったと考えられる。種間の血管系細胞への

親和性の違いが、ヒトとの病態の違いが現れる大きな要因と考えられた。

このモデルの病態の大きな特徴に血尿が起こることと、その起因となっている腎臓の間質性腎炎があげられる。この動物モデルではウイルスは静脈から接種され、ウイルス RNA が血中から検出されていた。さらに、病態の強い動物は血尿を示し、尿中からもウイルス RNA が検出された。尿中のウイルスは血液に由来するもので、尿の生成過程の中、尿細管上皮と血管との間で物質交換とともにウイルスも同部位で移行していたと考えられた。尿細管上皮細胞と血管を介在する部分が間質であり、移行のためには同部分をウイルスが通過しなければならない。事実、この炎症巣に出現したリンパ球の一部も免疫染色で陽性だった。この腎臓の変化は、血液から尿中に移行するウイルスに反応し、腎間質に炎症が惹起されたものと考えられた。

免疫組織学的検索にて多くの抗体を用いてきたが、ほとんどは DENV2 感染 vero 細胞には明瞭な陽性像を示すものの、感染マーマセットで良好な染色結果を示す抗体は見つからなかった。またいくつかの抗体は腎臓の近位尿細管上皮細胞および肝臓の胆管上皮細胞に非特異反応を示し、的確な抗原局在の判断を妨げる要因となっていた。

今回、DENV2 とその不活化抗原をそれぞれ 2 回接種されたマーマセット由来の抗血清を用いたところ、DENV2 接種マーマ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。一方で DENV2 と他の血清型の接種によって得られた抗血清では明確な陽性像が得られなかった。ヒトでは異なる血清型の DENV に感染すると病態の増

悪に働くが、同じ型の再感染は防御的に働くとされている。後者は液性免疫の介在で惹起されると考えられている。#17 を得た際の DENV2 の再接種は、このメカニズムと同様のことが起こり、マーマセットに強い液性免疫が誘導された結果、高い抗体価が得られ、免疫染色の良好な結果に繋がったと考えられた。

他の抗体を有効に使用するためには、ウイルス非接種マーマセットの腎臓ならびに肝臓を入手、ホモジナイズ材料にて非特異反応蛋白を吸収した上、用いることが望ましいと考えられた。

#### E. 結論

マーマセットを用いたデング熱ウイルス感染の動物モデルでは、ウイルスの標的は免疫系細胞であり、主に脾臓、リンパ節のリンパ球、マクロファージ、肝臓のクッパー細胞からウイルス抗原が検出された。また腎病変に出現したリンパ球にもウイルス抗原が検出され、マーマセットでのデング熱ウイルスの特徴的な病態形成に関与していることが推測された。組織学的にウイルス抗原の分布を明確にすることによって、ウイルスの挙動と表現される病変との関連、この動物モデルにおける病態発症の機序、さらにモデル動物としての有効性が明確になってきた。

#### F. 健康危機管理情報

なし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Sakurai F, Nakamura S, Akitomo K,

- Shibata H, Terao K, Kawabata K, Hayakawa T, Mizuguchi H. Transduction properties of adenovirus serotype 35 vectors after intravenous administration into nonhuman primates. *Mol Ther.* 16 (4):726-733, 2008
2. Suzuki T, Sakurai F, Nakamura S, Kouyama E, Kawabata K, Kondoh M, Yagi K, Mizuguchi H. miR-122a-regulated expression of a suicide gene prevents hepatotoxicity without altering antitumor effects in suicide gene therapy. *Mol Ther.* 16 (10):1719-1726, 2008
3. Sakurai F, Nakamura S, Akitomo K, Shibata H, Terao K, Kawabata K, Hayakawa T, Mizuguchi H. Adenovirus serotype 35 vector-mediated transduction following direct administration into organs of nonhuman primates. *Gene Ther.* 16 (2):297-302, 2009

2. 学会発表  
なし。

H.知的財産権の出願・登録状況  
なし。

