

厚生労働科学研究費補助金（新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業）
「我が国への侵入が危惧される蚊媒介性ウイルス感染症に対する総合的対策の確立に関する研究」（H23-新興-一般-010）

分担研究報告書（H23-25年度）

デングウイルス新規ワクチン開発のための病理学的評価系の確立

平成 23 年度 高橋秀宗 国立感染症研究所 感染病理部 第三室長

平成 24-25 年度 永田 典代 国立感染症研究所 感染病理部 第二室長

研究要旨：本研究では、デングウイルス様粒子を用いたワクチン開発を目標として、感染動物実験系とその病理学的評価系の確立を目的としている。初年度には、デングウイルス様粒子の発現を確認した。一方で、1～4 型全てのウイルスを VeroE6 細胞に継代しストックを調整した。次にこれらのウイルスを新生仔あるいは成マウスに接種し、その病原性を血液学的・組織学的に明らかにした。また、デングウイルス認識モノクローナル抗体を用いて、ELISA 法を利用したウイルス識別系と免疫組織化学法によるウイルス抗原検出系を確立した。

協力研究者：

国立感染症研究所 感染病理部 小島朝人、
鈴木忠樹、小谷治、岩田奈織子、長谷川秀樹

とした(平成 23 年度)。

また一方で、ワクチン評価系のための感染動物実験系とその病理学的評価系の確立を試みた（平成 24-25 年度）。

A. 研究目的

デングウイルス(DENV)は4つの血清型を持ち、感染者の吸血蚊が媒介するヒトを宿主とするウイルスである。異なる型の DENV に再感染した場合、致死性のデング出血熱を発症する。そのため、ワクチン施策には DENV 1～4 型に対する 4 価ワクチンが必須であると考えられており、現在のところ有効なワクチンは未だ無い。

我々は日本脳炎ウイルス様粒子(JE-VLP)、ウエストナイルウイルス様粒子(WNV-VLP)を利用したワクチン開発に携わってきた。そこで本研究では、WNV prM-E 遺伝子持続発現系によるウイルス様粒子抗原の産生、および JEV prM-E 遺伝子持続発現系による VLP 抗原の産生を利用して、デングウイルスサブユニットワクチン (DEN-VLP) の開発を目標

B. 研究方法

VLP の作出

JE-VLP、WNV-VLP 産生によるワクチン開発を基礎としてデングウイルスワクチンの開発を進めた。DENV 中和エピトープを含むフラビウイルスキメラ prM/E VLP 発現ベクターを 5 種作成し、ウエスタンブロットによって発現を確認した。

使用ウイルスと細胞

いずれも高崎智彦博士より分与いただいた。

- DENV 1 型: NIID10-07 標準株 (D1/Hu/Philippines)
- DENV 2 型: NIID20110116 株 (D2/Hu/INDIA09-74)
- DENV 3 型: Den 3, 00-27/1 株 (C6#1, Vero9013#1. 08 Decem, 2003)

- DENV 4 型: NIID 08-11 標準株 (D4/Hu/Solomon)

これらを VeroE6 細胞で継代し、培養上清で 10^5 PFU/ml 以上を回収できるように馴化した

ウイルス認識モノクローナル抗体

不活化 DENV 1~4 混合抗原でプレートをコートし、JEV-E 特異的・WNV-E 特異的単クローン抗体を対照にして、入手した 4 種の DENV 認識単クローン抗体の反応性を検討した。

感染動物実験

本動物実験は国立感染症研究所の動物実験委員会に承認された実験計画に従って実施した。

新生仔マウス

生後 1 日以内の ddY マウス (SLC より購入) に対し、VeroE6 細胞で 4 継代目のウイルス感染細胞上清をそれぞれマイクロシリンジで $10 \mu\text{l}$ 、右側視床内に脳内接種した。対照群には細胞培養液 MEM $10 \mu\text{l}$ を同様に接種した。

接種後 25 日まで体重測定、臨床症状の観察を行い、病原性発現の有無を検討した。また、接種 3, 7, 25 日目に 3 または 4 匹ずつ過麻酔殺後に解剖を行い、ホルマリン灌流固定パラフィン包埋組織標本作製した。なお、臨床症状の発現を確認し哺乳困難と判断した個体は、過麻酔殺し病理標本作製した。

成マウス

6 週齢の ddY マウス (SLC より購入) に対し、VeroE6 細胞で 4 継代目のウイルス感染細胞上清をそれぞれ $100 \mu\text{l}$ 静脈内接種した。対照群には細胞培養液 MEM $100 \mu\text{l}$ を同様に接種した。

接種後 15 日まで体重測定、臨床症状の観察を行い、病原性発現の有無を検討した。また、接種 3, 15 日目に 4 匹ずつ過麻酔下で心臓採血を行い、その後解剖し、ホルマリン固定パラフィン包埋組織標本作製した。

病理学および免疫組織学的検索

10%ホルマリン緩衝液灌流および浸漬固定

後の DENV1-4 型感染マウス組織材料 (脳、脊髄、心、肺、腎、肝、脾) を用いて、常法どおりパラフィン包埋切片を作製した。脱パラフィン後、一部はヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色を実施した。また、ウイルス抗原を検出するために、一次抗体として Anti-Dengue Virus E glycoprotein antibody [8] (ab80914) を用いて免疫組織化学染色を実施した。脱パラフィンした切片を抗原賦活化剤 (pH6.0) (ニチレイ) 中で 121°C 10 分オートクレーブ処理によって抗原賦活化し、過酸化水素水・メタノール (室温 30 分) による内因性ペルオキシダーゼの阻止を行った。その後は、ヒストファイブ マウスキット [マウス組織用マウス第一抗体] (ニチレイ) を用い、プロトコールに従い免疫染色を行い、ウイルス抗原を検出した。なお、1 次抗体は 2000 倍希釈し、 4°C で一晩インキュベートした。

C. 結果

1. DEN-VLP 発現ベクターの作成と発現確認: DENV 中和エピトープを含むフラビウイルスキメラ prM/E VLP 発現ベクターを 5 種作成し、ウエスタンブロットによって発現を確認した。

2. DENV ウイルスストックの調製: ウイルス分離・ウイルス増殖に汎用されている Vero 細胞を用いてウイルスストックの調整を試みた。DENV NS1 抗原ストライプを用いた検討では、DENV 3 以外は何れもウイルス増殖陽性であった。DENV 3 は NS1 抗原陽性に転換するまで Vero 細胞での継代を繰返し、最終的に DENV 1~4 のウイルスストックを調製した(表)。

3. DENV 認識単クローン抗体 ELISA: 不活化 DENV 1~4 混合抗原、JEV、WNV 不活化粒子でプレートをコートし、JEV-E 特異的・WNV-E 特異的単クローン抗体を対照にして、入手した 4 種の DENV 認識単クローン抗

体の反応性を検討した。その結果、2H2 は DENV にのみ反応し、JEV にも WNV にも全く反応性を示さなかった。一方、4G2 は DENV, JEV, WNV 何れにも強い反応性を示した。他方、JEV, WNV などの単クローン抗体 503, N.04 は JEV のみ、WNY-11 は WNV のみ、402 は JE 血清型に属する JEV と WNV のみを認識した。

4. 新生仔 ddY マウスに DENV1 および 2 型を脳内接種したところ、感染 8-10 日目に音などの外部刺激に対して過敏反応を示し、突然走り出す、跳ねるなどの神経症状を示した。いずれもその後、哺乳困難、瀕死となったため病理解剖を行った。その結果、海馬、皮質、視床、延髄等の神経・グリア細胞にウイルス抗原陽性細胞が認められ（接種 7 日目）、これに伴う神経細胞の脱落、壊死、炎症性反応がみられた（瀕死期）。DENV3 型脳内接種マウスは感染 14 日前後から外部刺激に対する過敏反応を示し一定期間体重増加が対照群に比べて緩徐となったが、これは一過性で 25 日目には回復した。25 日目の脳組織において、巣状壊死、血管を中心とした炎症所見が見られた。病変部の変性細胞にウイルス抗原が検出された（25 日目）。DENV4 型接種マウスは 13 匹の新生仔マウスに脳内接種を行ったが、6 匹が接種翌日に死亡しており、残りの 7 匹も瀕死であった。これを病理解剖したところ、いずれの個体においても脈絡叢の血管は拡大し、血管内には血栓様の構造が見られた。ただし、この病変は脳に限局しており、肺・肝・腎などの微小血管内で同様の所見は得られなかった。

5. 成マウスはいずれの接種群も無症状で耐過した。2 型、3 型接種群は対照群を含めた他の群と比べて体重の上昇が良かった。接種 3 日目の血液検査では 2 型と 3 型接種群で血小板の有意な減少がみられ、15 日には上昇傾向が見られた。4 型接種群はいずれの接種日でも

低い傾向が見られた。また、ヘマトクリット値はウイルス接種 3 日目でいずれの接種群においても対照群に比べて低い傾向が見られたが、2 型接種群で有意な低値であった。いずれの個体も明らかな臨床症状を示さず、組織学的に著変はみられなかった。

D. 考察

DENV-VLP の作成において、ウイルス増殖性が低い DENV の 1~4 型全てでウイルスストックの調整に成功し、DENV 特異的な ELISA 系のみならず、JEV, WNV, JE 血清型群、全フラビウイルス識別 ELISA 系まで樹立できた。以上の結果は、DENV-VLP の発現、DENV, JEV, WNV 其々に特異的に反応する単クローン抗体のパネルが準備できたことを示すとともに、全フラビウイルスを識別できる抗体 ELISA 系が樹立できた事も示している。また、実験に供するレベルのウイルス価が得難いとされる DENV について、1~4 型のウイルスストックの調整に成功したことは今後の感染価測定法の確立に繋がる成果であろう。DENV-VLP ワクチン作成の有力な基盤が得られたものと思われる。

一方、マウスにおける増殖性・病原性について検討したところ、今回使用した DENV4 型 NIID 08-11 標準株は、脳内接種後の新生仔マウスに非常に強い毒力を示したが、ウイルスが増殖した結果による病原性ではないと考えられるため、死因について更なる検討が必要である。組織所見から、接種後に局所に限局した急激な血液凝固反応あるいはショックを引き起こしたと考えられる。DENV1 と 2 型分離株は新生仔マウスの神経細胞、グリア細胞で増殖が可能で、ほぼ同様の病原性を発揮することが病理学的に示された。ただし、DENV2 型分離株の方が、血管を中心とした炎症性反応が強い傾向が見られた。この血管病変についても着目する必要がある。

成マウスを用いた感染実験では、接種後に血液像に変化が見られたことから、VeroE6 継代株は成マウスに対しても感染性を有すると考えられた。これまでの感染実験の結果について表に総括した。今後は、結果に基づいて、これらのウイルスと齢の異なるマウスを用いて重複感染実験を行い、病原性解析とワクチン攻撃実験に必要な動物実験系を確立する。

E. 結論

DEN-VLP の発現を確認し、ウイルス増殖性が低い DENV の 1~4 型全てのウイルスストックの調整に成功し、DENV 特異的な ELISA 系のみならず、JEV, WNV, JE 血清型群を含む、全フラビウイルスを識別できる ELISA 系まで樹立できた。

DENV1-4 型分離株を使用して、新生仔および成マウスにおける病原性を明らかにした。一方で、VeroE6 細胞、マウス組織を使用したホルマリン固定パラフィン包埋参照標本を作

製し、ウイルス抗原検出系を確立した。

G. 研究発表

研究成果の刊行に関する一覧表に記載した。

F. 健康危険情報

特になし

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

表 デングウイルス分与株の VeroE6 細胞における増殖性と ddY マウスに対する病原性

血清型	ウイルス株名	VeroE6 細胞		ddY マウスに対する病原性		
		継代数	上清の感染価 pfu/ml	新生仔・脳内 10 µl	新生仔・皮下 10 µl	6 週齢・静脈内 100 µl
1 型	NIID10-07 標準株 (D1/Hu/Philippines)	4	1.4 x 10 ⁶	有(致死的)	有(弱)	無
2 型	NIID20110116 株 (D2/Hu/INDIA09-74)	4	1.7 x 10 ⁶	有(致死的)	有(一過性)	有(一過性)
3 型	Den3,00-27/1(C6#1, Vero9013#1. 08Decem, 2003)	4	1.6 x 10 ⁵	有(一過性)	無	有(一過性)
4 型	NIID 08-11 標準株 (D4/Hu/Solomon)	4	8.8 x 10 ⁵	有(致死的)	有(弱)	無