

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)

チクングニアウイルスのコモンマーモセットモデルにおける病理学的解析お
よび夏期の日本旅行後デング熱を発症したドイツ人デング熱患者症例と実験
室確認診断

研究分担者 倉根一郎 (国立感染症研究所副所長)
研究協力者 林 昌宏 (国立感染症研究所ウイルス第一部第三室長)
高崎智彦 (国立感染症研究所ウイルス第一部第二室長)
鈴木隆二 (国立相模原病院臨床研究センター診断治療研究室長)
網 康至 (国立感染症研究所動物管理室主任研究官)
藤井克樹 (国立感染症研究所ウイルス第二部研究員)
モイ メンリン (国立感染症研究所ウイルス第一部研究員)
北浦一 孝 (国立相模原病院臨床研究センター診断治療研究室流動研究員)
白井顕治 (筑波大学大学院人間総合科学研究科ウイルス医学)
松井珠乃 (国立感染症研究所感染症疫学センター)
森川 茂 (国立感染症研究所獣医科学部長)
西條政幸 (国立感染症研究所ウイルス第一部長)

研究要旨

チクングニア熱が近年アフリカ東岸から南アジア, 東南アジアにかけて大流行している. また温帯地域における初めての国内流行がイタリア (2007 年), フランス (2010 年) に 7 報告された. したがって媒介蚊の生息する日本国内へのチクングニアウイルス (CHIKV) の侵淫の可能性は否定できない. これまでに我々はコモンマーモセットを用いた CHIKV 感染モデルの検討を行った. その結果, CHIKV の接種により高いウイルス血症と迅速な特異的抗体の上昇を観察した. そこで本研究において CHIKV 接種マーモセットに対する病理学的解析を行った. その結果 CHIKV 接種 4~21 日の長期に渡り脾臓および腋窩リンパ節にウイルス遺伝子が検出された. また肝臓および脾臓において特異的抗原が検出され, 肝臓においては肝のシングルセルネクロシス, 細胞浸潤, 脾臓においては二次濾胞の形成および starry sky 像が観察された.

日本 (本州) 旅行から帰国したドイツ人が, 2013 年 9 月 9 日にドイツ (ベルリン) の病院を受診. 9 月 3 日より, 40 度の熱, 嘔気, 続いて, 斑状丘疹状皮疹が出現. 入院 9 日前に, 2 週間の日本旅行 (8 月 19~31 日) から直行便にて帰国した. 鑑別診断の結果, 臨床像よりデング熱を疑った. 発症後 7 日目の血清で, デングウイルス IgM 及び IgG 抗体価試験, デングウイルス NS1 抗原及び迅速試験で全て陽性であったことから, 患者はデングウイルス急性感染であることが示された. デングウイルス RNA 遺伝子は陰性であった. 日本からのデング熱の輸入症例は極めて珍しいことから, 2013 年 12 月 (発症後 110 日目) に第 2 回目の血清を採取して検査した. 検体をドイツから国立感染症研究所に送付していただき, 確認検査を実施した. その結果, デングウイルス非構造蛋白抗原陽性, 抗デングウイルス IgM 抗体陽性, IgG 抗体陽性であった. また, 中和抗体を測定した結果, デングウイルス 2 型に対して 1, 3, 4 型および日本脳炎ウイルスに対する中和抗体価より有意

に高く、デングウイルス 2 型感染であったと診断された。

A. 研究目的

近年チクングニアウイルス (Chikungunya virus: CHIKV) がアフリカ東岸からインド, 東南アジアにかけて再興している. 我が国においても毎年 10 数例の輸入症例が報告されている. CHIKV はトガウイルス科アルファウイルス属に分類される一本鎖の (+)RNA ウイルスであり, チクングニア熱の原因ウイルスである. CHIKV は蚊媒介性ウイルスであり, その媒介蚊はネッタイシマカ (*Aedes aegypti*) や日本にも広範囲に生息するヒトスジシマカ (*A. albopictus*) などのヤブカ属のカである. 2005 年のレユニオン島でのチクングニア熱の流行においては, 呼吸器不全, 心代償不全, 髄膜脳炎, 劇症肝炎, 腎不全等の症状と 219 人の死者が報告された. したがってチクングニア熱の病態はいまだ不明である. 近年コモンマーモセット (マーモセット) が新たな霊長類モデルとして注目されている. そこで我々はマーモセットを用いた CHIKV 感染モデルの検討を行った. その結果, CHIKV の接種により高いウイルス血症と迅速な特異的抗体の上昇を観察した. そこで本研究の目的は CHIKV 接種マーモセットに対する病理学的解析を行うことである.

また, デング熱もチクングニア熱ともにウイルス血症が高く輸入症例から国内発生の可能性がある. ドイツ Bernhard Nocht Institute for Tropical Medicine およびロベルトコッホ研究所からの情報提供を受け, 日本からの輸出デング熱疑い症例の確認検査を実施した.

B. 研究方法

マーモセットモデル

ウイルスと培養細胞: 感染実験には CHIKV SL10571 株を供試した. ウイルス分離およびウイルス中和試験にはサル腎由来の Vero 細胞を用いた (American Type Culture Collection).

動物: 体重 300 g ~ 379 g のコモンマーモセ

ット (*Callithrix jacchus*) を用いた. ウイルス学的解析は採取した組織よりウイルス遺伝子を抽出し, TaqMan リアルタイム RT-PCR 法により組織中のウイルス遺伝子量を検出した. 採取した組織は病理学的解析を実施した.

輸出デング熱症例の検討 (検査方法)

1) デングウイルス NS1 抗原検出

Platelia Dengue NS1 Ag ELISA キット (BioRad 社) を用いた.

2) 抗デングウイルス IgM 抗体

抗デングウイルス IgM 抗体捕捉 ELISA キット (Focus Diagnostics 社) を用いた.

3) 抗日本脳炎 IgM 抗体

抗日本脳炎ウイルス IgM 抗体捕捉 ELISA 法 (in house) により, P/N 比 = (検体の OD 値) / (陰性コントロールの OD 値) を算出し, P/N 比 2.0 以上を陽性と判定した.

4) 抗デングウイルス, 日本脳炎ウイルス中和抗体測定

BHK 細胞, Fc γ R 発現 BHK 細胞, Vero 細胞を用いた 50% プラーク減少法により測定し, 10 倍希釈よりの 2 倍階段希釈法により Endpoint を決定し抗体価を決定した.

C. 研究結果

● マーモセットモデル

組織中の CHIKV RNA 量の検討: 脾臓, 腋窩リンパ節においてウイルス RNA が検出された. 脊髄, 大腿筋, 心筋, 大脳, 小脳, 肺からはウイルス RNA は検出されなかった. また対照個体である #5017 からはウイルス RNA は検出されなかった.

病理学的解析: マーモセットの肝臓において, 細胞浸潤, 肝のシングルセルネクローシスが認められ, 類洞内への細胞浸潤, 肝細胞, 肝管上皮細胞および kupper 細胞に特異的抗原が観察された. 肝細胞, kupper 細胞に特異的抗原が観察された. また脾臓においては二次濾胞の形成, 二次濾胞において starry sky 像

が観察された。

● 輸出デング熱症例の検討

日本からのデング熱の輸入症例は極めて珍しいことから、ドイツ Bernhard Nocht Institute for Tropical Medicine では、2013年12月（発症後110日目）に第2回目の血清サンプルを採取し、デングウイルス IgM 及び IgG 抗体が有意に減少、デングウイルス NS1 抗原（ELISA 法、迅速試験）が陰性との結果が得られたことから、患者はデングウイルスに感染したと判断された。IgG 抗体が、20480 倍から 640 倍に有意に低下したという点が、通常デング熱感染では起こらない現象であるため、ワクチン接種歴を確認したところこの患者は 2009 年に、ケニヤに旅行する際に黄熱ワクチンを接種していたことが判明した。

デングウイルスおよび日本脳炎ウイルス IgM 捕捉 ELISA 法によりそれぞれの IgM 抗体を測定したところ、デングウイルスに対しても日本脳炎ウイルスに対しても陽性であったが、デングウイルスに対して高かった。また中和抗体価の測定結果では、デングウイルス 2 型に対して 640 倍、1 型および 3 型に対して 10 倍、4 型に対して 10 倍以下、日本脳炎ウイルスに対して 40 倍であった。また、FcγR 発現 BHK 細胞を用いた場合でもデングウイルス 2 型に対して有意な低下を認めず 320 倍であった。

D. 考察

CHIKV 接種 3, 7, 10, 21 日後に安楽殺を行いコモンマーマセットの各臓器を採取しウイルス学および病理学的解析を行った。接種後 4~21 日の長期に渡り脾臓および腋窩リンパ節にウイルス遺伝子が検出されたことから CHIKV の感染が成立した可能性が示唆された。また肝臓、脾臓に特異的抗原が検出され、肝細胞に特異的抗原の観察、肝のシングルセルネクロシス、細胞浸潤が観察され、さらに脾臓においては二次濾胞の形成および二次濾胞内に starry sky 像が観察さ

れたことから CHIKV の感染が成立した可能性が示唆された。

ドイツ Bernhard Nocht Institute for Tropical Medicine では、抗体測定に蛍光抗体法 (IF) を用いている。この方法で IgG 抗体を測定すると感度が良いためかなりの交差反応を拾うことになる。急性期血清中の IgG 抗体価が 20,480 と非常に高値であったのは、2009 年に接種した黄熱ワクチンによる IgG 抗体が交差反応し抗体価を押し上げたものと考えられる。2013 年は FIFA ワールドカップがデング熱および黄熱の流行地であるブラジルで開催されることから黄熱ワクチン接種後のブラジルからのデング熱輸入症例の発生が危惧されているところである。血清診断において本症例と同様の現象がみられる可能性が高く十分な注意が必要である。

E. 結論

急速な輸送手段の発達とネッタイシマ蚊、ヒトスジシマ蚊の分布拡大、熱帯雨林地域への人口拡張により世界の熱帯・亜熱帯地域、特に東南アジアにおいてチクングニア熱およびデング熱は今後も流行が続くことが予想される。したがって日本においてもサーベイランス体制の充実、媒介蚊対策、将来のワクチン開発、特異的治療法の開発は重要な課題である。

F. 健康危険情報

特記事項なし

G. 研究発表

研究成果の刊行に関する一覧表に記載した。

H. 知的財産権の出願・登録状況

特記事項なし