

厚生労働科学研究委託費  
新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業  
委託業務成果報告（業務項目）

（委託業務題目）

国内侵入・流行が危惧される昆虫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

担当責任者研究報告書

マーモセットを用いた再感染デング熱動物モデルの構築

担当責任者 モイメンリン（長崎大学熱帯医学研究所、国立感染症研究所）  
研究協力者 高崎智彦、倉根一郎、林昌宏（国立感染症研究所）  
網康至、須崎百合子（国立感染症研究所動物管理室）  
鈴木隆二、白井顕治、北浦一孝、宮田幸長（国立病院機構相模原病院）

**研究要旨**

本研班ではこれまでに確立した初感染のデング熱モデル動物のマーモセットが再感染モデル動物モデルとして有用であるかをウイルス学および免疫学的に検討した。再感染モデルの評価には、ウイルス接種後、経時的にウイルス血症定量、IgM/IgG 抗体の測定、中和抗体測定を行った。今回の検討により、全ての再感染個体において、初感染と異なる血清型の接種により、高ウイルス血症の誘導が認められた。この結果から、マーモセットは再感染時において感染が成立し、症状を呈することが明らかとなった。さらに、再感染個体の血中には、感染性ウイルス—抗体複合体が FcγR 発現 BHK 細胞にて検出された。さらに、再感染後のマーモセットにおいては、型特異的抗体および型交叉性中和抗体の上昇がすべての個体に認められた。本研究により、デング熱モデル動物であるマーモセットは、再感染時にデングウイルス接種後において高ウイルス血症が誘導されるとともに再感染デング熱の特徴である感染性ウイルス—抗体複合体が形成されることが明らかとなった。さらに、中和抗体および IgM/IgG 抗体上昇パターンは、デング熱再感染患者と似ていることから、本マーモセットモデルは、ワクチン評価モデル、再感染の病態機序解明に有用であることが明らかとなった。

**A. 研究目的**

デングウイルスは、蚊によって媒介されるフラビウイルスであり、世界的に大規模な

流行を起こしている。年間約 25 億人がデング熱流行地域に生活しており、発症者数が約 1 億人である。デングウイルスは、4 つの血清型が存在し、いずれの血清型も同様な病態を

引き起こす。デング熱の特徴としては、一つの血清型に感染されることにより、同じ血清型に対する終生防御免疫が誘導される。しかし、異なる血清型に対する防御免疫は、短期間に消失する。このように、初感染における型交叉性防御免疫が消失するとともに、異なる血清型に感染しうる状態となる。さらに、再感染における型交叉性抗体は、異なる血清型と交叉性を有することにより、ウイルス-抗体複合体が形成される。このウイルス-抗体複合体は、Fc $\gamma$ R を有する細胞の感染を増強させ、デング出血熱の特徴である高ウイルス血症誘発の要因であると考えられている。

我々は、マーマセツトを用いてデング熱初感染モデル動物を確立することに成功した(Omatsu et al., 2011)。本モデル動物は、初感染時に、高ウイルス血症を示すとともに、誘導された免疫は、デング熱患者と似ていることが明らかとなった。本研究では、マーマセツトを用いてデング熱再感染モデル動物の確立と、病態解明・感染防御解析系の確立を目的とし、デングウイルスの再感染によってマーマセツトにおけるウイルス学および免疫学的な解析を行った。

## B. 研究方法

**霊長類:**マーマセツト 13 個体を用いた。本研究は、国立感染症研究所動物実験委員会の審査において承認を受け、国立感染症研究所における動物委員会のガイドラインに基づいて実施した。

**ウイルス:** DENV-1 02-17 株, DENV-1 01-44 株, DENV-2 DHF0663 株 (GenBank accession no. AB189122) および DENV-3 DSS1403DHF0663 株を用いた。中和試験には、

DENV-1 (01-44 株)、DENV-2 (DHF0663 株)、DENV-3 (CH53489 株) および DENV-4 (TVP-360 株)を用いた。

**ウイルス接種:**デングウイルス 2 型の感染歴を有するマーマセツト 9 個体には、デングウイルス 1 型の感染実験を行った。さらに、DENV2 の感染歴を有する 2 個体に、DENV3 の接種を行った。さらに、DENV 感染歴のない 2 個体には、DENV1 の接種を行った。DENV 接種前および接種後 2、4、7、10、14 日目に採血を行った。

**実験室検査:**RT-PCR にてウイルス血症の定量を行った。さらに、BHK 細胞、Fc $\gamma$ R 発現細胞にて感染性ウイルスの定量を行った (Omatsu et al., *J Gen Virol*, 2011; Moi et al., *J Infect Dis.*, 2011)。デングウイルス中和抗体価は、BHK 細胞および Fc $\gamma$ R 発現細胞にて測定した(Moi et al., *PLoS Neg Trop Dis*, 2012)。

## C. 研究結果

**ウイルス血症:**接種前および接種後 2、4、7、14 日目におけるウイルス血症を RT-PCR にて測定した。すべての個体において、高ウイルス血症の誘導が確認できた。さらに、ウイルス血症は、接種 2 日目から 10 日目まで検出された。

さらに、BHK 細胞および Fc $\gamma$ R 発現細胞にてウイルス血症の測定を行った。再感染のマーマセツトにおけるウイルス血症を Fc $\gamma$ R 発現細胞にて検出されたところ、ウイルス血症は、BHK 細胞より 10 倍高いということが明らかとなった。さらに、Fc $\gamma$ R 発現細胞にて測定したところ、ウイルス血症は BHK 細胞より、約 1 日長く継続したことが明らかとなっ

た。初感染の個体においては、いずれの BHK 細胞および Fc $\gamma$ R 発現細胞を用いてもウイルス血症のレベルに相違が認められなかった。

**IgM/IgG 抗体：**初感染および再感染における IgM/IgG 抗体の上昇パターンを検討した。初感染の個体において、感染 4 日目から IgM 抗体の上昇が認められた。しかし、再感染の個体には、感染 7~10 日目から IgM 抗体の上昇が認められた。さらに、初感染の個体において、感染 7 日目から IgG 抗体の上昇が認められた。再感染の個体においては、感染 0 日目から IgG 抗体が認められた。

**中和抗体価の検討：**初感染のマーモセット（2 個体）および再感染の個体（6 個体）における中和抗体価を経時的に測定した。再感染の個体において、接種 0 日目~4 日目においては、初感染のウイルス血清型(DENV2)に対する中和抗体価が $>1:10$ であった。さらに、接種 14 日目には、すべての血清型(DENV1-4)に対する中和抗体が検出された。さらに、BHK 細胞にて測定された中和抗体価は、Fc $\gamma$ R 発現細胞より高価であることが明らかとなった。DENV1 の接種を受けた初感染のマーモセットでは、同血清型(DENV1)に対する高価な中和抗体が誘導された。

#### D. 考察

DENV 再感染マーモセットモデルにおける高いウイルス血症、抗体上昇パターン、感染性ウイルス-抗体複合体の検出は、デング熱再感染患者の兆候と似ている。さらに、DENV 感染歴を有するマーモセットにおいて、デング熱患者と同様に、異なる血清型ウイルスに対する防御免疫がなかったことは、再感染実

験にて証明することに成功した。RT-PCR にて測定したウイルス血症は、初感染および再感染において同じレベルであったが、再感染のマーモセットにおけるウイルス血症は、初感染の個体より約 1 日長く継続した。さらに、再感染個体において、感染性ウイルス-抗体複合体が検出された。初感染の個体では、感染後 IgG 抗体および中和抗体の速やかな上昇が認められた。一方、IgM 抗体の上昇は、初感染より遅れている。

#### E. 結論

デングワクチン・治療開発にはモデル動物が不可欠である。そこで、我々は、マーモセットにおけるウイルス血症および免疫誘導がデング熱再感染患者と似ていることを明らかにした。さらに、再感染時に高価な型交叉性中和抗体が検出されたことから、本モデルでは、記憶免疫（T 細胞および B 細胞）が誘導されたことが示唆された。以上の結果から、本モデル動物は、ワクチン評価や再感染における免疫の役割解明に有用であることが示唆された。

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. [Moi ML](#), Takasaki T, Omatsu T, Nakamura S, Katakai Y, Ami Y, Suzaki Y, Saijo M, Akari H, Kurane I. Demonstration of marmosets (*Callithrix jacchus*) as a non-human primate model for secondary dengue

- virus infection: high levels of viraemia and serotype cross-reactive antibody responses consistent with secondary infection of humans. *Journal of General Virology*, 95(Pt 3):591-600, 2014.
2. Moi ML, Takasaki T, Saijo M, Kurane I. Determination of antibody concentration as main parameter in a dengue virus antibody-dependent enhancement assay using FcγR-expressing BHK cells. *Archives of Virology*, 159(1):103-116, 2014.
  3. Tajima S, Kotaki A, Yagasaki K, Taniwaki T, Moi ML, Nakayama E, Saijo M, Kurane I, Takasaki T. Identification and amplification of Japanese encephalitis virus and Getah virus propagated from a single porcine serum sample: A case of coinfection. *Archives of Virology*. 159(11): 2969-75, 2014.
  4. Kutsuna S, Kato Y, Takasaki T, Moi ML, Kotaki A, Uemura H, Matono T, Fujiya Y, Mawatari M, Takeshita N, Hayakawa K, Kanagawa S, Ohmagari N. Two cases of Zika fever imported from French Polynesia to Japan, December 2013 to January 2014. *Euro Surveillance*, 19(4). pii: 20683, 2014
  5. Tochitani K, Shimizu T, Shinohara K, Tsuchido Y, Moi ML, Takasaki T. A first case report of Ross River virus disease patient in Japan who came back from Australia. *The Journal of the Japanese Association of Infectious Diseases*, 88:155-159, 2014.
  6. Moi ML, Takasaki T. 帰国後診療：デング熱. 実地医家のための渡航医療. 診断と治療. 102:4, pp560-566, 2014.
  7. Moi ML, Takasaki T. マレー半島脳炎ウイルス. 神経症候群 I. 26: pp607-612, 2014.
2. 学会発表
- 1) 国際学会
    1. Moi ML, Rattanamahaphoom J, Lim CK, Sirivichayakul C, Saijo M, Sabchareon A, Takasaki T, Kurane I. Neutralizing antibody titers as a surrogate for protection against dengue: a revisit of neutralizing antibody titers of dengue virus using FcγR-expressing cells. Joint International Tropical Meeting (JITMM) (Bangkok), December, 2014.
    2. Moi ML, Shirai K, Ami Y, Lim CK, Suzaki Y, Kitaura K, Saijo M, Suzuki R, Takasaki T, Kurane I. Development of a non-human primate model for primary and secondary dengue virus infection using marmosets (*Callithrix jacchus*). The 63rd Annual Meeting of the American Society of Tropical Medicine and Hygiene (New Orleans, Louisiana, USA) November, 2014
  - 2) 国内学会

1. モイメンリン. デングワクチンの実用化への展望. 石橋記念講演 (東京) 2014年11月.
  2. Moi ML, Shirai K, Ami Y, Miyata Y, Lim CK, Suzaki Y, Kitaura K, Saijo M, Suzuki R, Kurane I, Takasaki T. Demonstration of common marmosets (*Callithrix jacchus*) as a non-human primate model for dengue vaccine development: 第62日本ウイルス学会学術集会. (東京) 2014年11月
  3. 齋藤悠香, モイメンリン, 竹下望, 林昌宏, 司馬肇, 細野邦昭, 西條政幸, 倉根一郎, 高崎智彦. FcγR 発現細胞を用いた新規中和アッセイにて日本脳炎ワクチン接種者におけるデングウイルスに対する中和・感染増強の検討. 第62日本ウイルス学会学術集会. (東京) 2014年11月
  4. 山中敦史, モイメンリン, 高崎智彦, 倉根一郎, 小西英二. デング1型ウイルスの遺伝子型がヒトにおける中和・感染増強応用に及ぼす影響. 第62日本ウイルス学会学術集会. (東京) 2014年11月
  5. 齋藤悠香, モイメンリン, 小滝徹, 池田真紀子, 田島茂, 司馬肇, 細野邦昭, 西條政幸, 倉根一郎, 高崎智彦, 尿中デングウイルス非構造タンパク (NS1) 抗原のELISA法による検出, 第55回日本熱帯医学会大会, (東京) 2014年11月
- 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

厚生労働科学研究委託費  
新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業  
委託業務成果報告（業務項目）

（委託業務題目）

国内侵入・流行が危惧される昆虫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

担当責任者研究報告書

マーモセットにおけるデング感染（再感染）モデルの病理学的解析

担当責任者	鈴木 隆二	国立病院機構相模原病院	臨床研究センター	室長
研究協力者	鈴木 さつき	日本歯科大学生命歯学部		
	モイ・メンリン	国立感染症研究所ウイルス第一部		
	北浦 一孝	国立感染症研究所ウイルス第一部		
	宮田 幸長	国立病院機構相模原病院	臨床研究センター	
	高崎 智彦	国立感染症研究所ウイルス第一部		

研究要旨： 近隣諸国で流行が認められているデングウイルスはヒトに感染すると、急性熱性疾患、出血熱、関節炎などの疾病を伴い、本邦においても地球環境の変化によりその感染拡大が懸念されていたが、昨年、海外渡航歴が無く国内感染患者が 69 年ぶりに発見され、総計 160 名の感染患者が 15 都道府県で確認された。デングウイルス感染症に対しては認可されたワクチンが無く、また、有効な治療薬も無いのが現状である。その理由として、デングウイルス感染動物モデル系が無いのが隘路となっている。我々は、既に、新世界サルに属する小型の霊長類であるコモンマーモセットがデングウイルスに初回接種により感染することを見出して報告してきた。今回、デングウイルス再感染による病態解析に一環として、病理組織学的な検討を行い、網内系臓器（肝臓・脾臓）、および腎臓に於ける反応変化、また、皮膚に於ける出血の有無に関して詳細に検討を行う伴に、免疫系の惹起に関してはサイトカインの変動を検討したので報告する。

#### A. 研究目的

デングウイルス（DEV）は、蚊の吸血によりヒトへ感染し、発熱のみならず致死的な出血熱などの疾病を起こすことがある。本邦では過去に東南アジアから侵入した DEV が、ヒトスジシマカによって媒介されることが知られている。昨年度、日本国内で発生した DEV 感染者の発見から、再興感染症として監視が必要であると伴に、早期にワクチン創製に向けた対応が急務である。

DEV はマウスにおいて感染が成立しない。したがって発症メカニズムやワクチン開発に必要な情報が不足しているため、霊長類をベースとした発症モデルの作成、病態解明等の基礎的研究は急がなければならない。

コモンマーモセットは新世界猿に属する小型の霊長類であり、非ヒト霊長類モデルとして生理学、神経学等の研究で利用されている。他

の霊長類モデル動物と比べて小型で多産であることから、本動物において感染モデル系を確立することは有用である。そして感染時の病態を評価するために、感染病態の病理学的検討と免疫学的解析の基盤整備も平行して進めなければならない。

コモンマーモセットを用いた DEV 感染モデル系の確立を目的とした。

#### B. 研究方法

(1) コモンマーモセットにおける DEV 再感染モデルの確立：コモンマーモセットに DENV-2 を接種後、126 週～75 週間の間隔を開けて DENV-1 を接種し、再感染接種後に 2 週間後の臓器を採取して病理組織学的検討を行った。また、この間に血液を経時的に採血して、Real-time PCR によるサイトカイン等の発現解析および臓器の肝臓、脾臓、腎臓など各

臓器の病理学的解析を実施した。

(倫理面への配慮)

動物実験は、国立感染症研究所および各関連施設における実験動物委員会のガイドラインにしたがって実施した。

### C. 研究結果

(1) Real-time PCR によるサイトカイン等の発現解析系：DENV 再感染に伴う炎症性サイトカインの変化を検出するため、それらの数値を補正するためのハウスピーキング遺伝子に対する特異的プライマーを設計し、5種類の遺伝子 (IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , IL-5, IL-2, IL-10) の発現解析を行った結果、再感染2日後に IL-2, IL-5 の優位な増加が確認され、7日後までに感染前のレベルに低下した。IFN $\gamma$  は4日後に優位な増加が確認され、その増加は14日まで継続した。IL-10 は感染4日目から減少し10日目まで経時的に低下し14日目でもその低下は継続していた。

(2) 再感染後の各種臓器の病理学的検討：

肝臓：①一般的なウイルス感染症と同様に、進行すると網内系 (肝・脾) に反応性変化をしました。②肝・脾の細胞への感染を伴い、炎症性反応を示唆する所見が出現した。③肝の変化は、感染後は肝細胞の腫大、肝実質への炎症性細胞浸潤がウイルス感染の程度と炎症の反応性変化の程度で変化が確認された。④肝細胞の腫大はウイルス感染により破壊された肝細胞の再生による所見で、肝実質への炎症性細胞浸潤は破壊された細胞の処理の反応性変化が確認された。⑤126~92週後に再感染した群で炎症性細胞浸潤が高度である。⑥41週後に再感染した群では、炎症性細胞浸潤が軽度である。⑦75週後に再感染した群では、高度~軽度までの個体が存在する。⑧肝臓の病理変化は、初感染の際のウイルス接種量と再感染時のウイルス接種量間に明確な依存性は確認されていないが、再感染時のウイルス接種量は、 $1.00E+09$ ~ $1.00E+03$  の個体でも確認された。

脾臓：①脾臓の変化は、白脾髄の拡大、胚中心の出現、赤脾髄へのリンパ球の出現程度の増加であり、いずれもウイルス感染により生じた反応性変化が観察された。

腎臓：①腎臓に於いては、びまん性で区域差の無い間質性腎炎が観察された。

皮膚：①皮膚に関しては皮下血腫と血栓を伴っ

た静脈の像が確認された症例があった。

その他、肺、消化管、脳、心臓には明らかな変化は観察されなかった。

### D. 考察

本研究では、コモンマーモセットを用いて非ヒト霊長類ウイルス感染モデル系を作成することにある。今回は、異なるタイプの DENV による再感染を行い、感染モデル系を評価するために病理組織学検討と免疫学的解析として各種サイトカインの発現解析を Real-time PCR 系を用いて行った。病理組織学検討により、①DENV 再感染による肝細胞の腫大範囲が再生の程度を示唆し、炎症性細胞浸潤の程度は破壊後の程度を示唆された。②脾臓に関しては、胚中心の出現と赤脾髄へのリンパ球浸潤の程度は、ウイルス感染の程度と相関することが示唆された。また、腎臓では間質性腎炎を主とし円柱、うっ血、組織破壊像が顕著であり、既報した血尿の症状を理解できる。皮膚における変化として皮下失血増が確認され、ヒトに於ける点状出血、毛細血管の破綻と極めて類似した病態を呈していた。

### E. 結論

本研究により、マウスでは感染が成立しないウイルスに対して、非ヒト霊長類感染モデル動物としてコモンマーモセットに注目した結果、Real-time PCR 系によって感染の成立が確認された。また、病理組織学検討により、ヒトの臨床症状と類似した臨床像を呈する事が確認された。以上のことから、今回の再感染モデル系はワクチンの評価系に充分に対応できる可能性がある。今後コモンマーモセットにおける免疫学的解析ツールを充実させることで、感染時の病態に対する詳細な情報が得られるものと思われる。

### F. 健康危険情報

特記事項なし。

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

Shirai K, Hayasaka D, Kitaura K, Takasaki T, Morita K, Suzuki R, Kurane I.

Qualitative differences in brain-infiltrating T cells are associated with a fatal outcome in mice infected with Japanese encephalitis

virus.

Arch Virol. 2015 Jan 22. [Epub ahead of print]PMID: 25604524

Moi ML, Ami Y, Shirai K, Lim CK, Suzaki Y, Saito Y, Kitaura K, Saijo M, Suzuki R, Kurane I, Takasaki T.

Formation of Infectious Dengue Virus-Antibody Immune Complex In Vivo in Marmosets (*Callithrix jacchus*) After Passive Transfer of Anti-Dengue Virus Monoclonal Antibodies and Infection with Dengue Virus.

Am J Trop Med Hyg. 2015 Feb 4;92(2):370-6. doi: 10.4269/ajtmh.14-0455. Epub 2014 Dec 29. PMID: 25548383 [PubMed - in process]

2. 学会発表  
なし

H 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1 : 特許取得

なし。

2 : 実用新案登録

なし。

3 : その他

なし。

### デングウイルス再感染モデル —実験系—

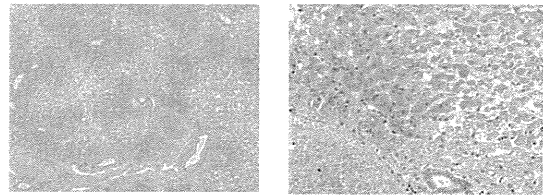
Inoculum	Secondary Infection Mechanism		Date of Inoculation	Date of Sampling	Date of Necropsy	Virus Isolation	Virus Strain	Virus titer (copies/ml)
	Animal No.	Organism						
Experiment 1	001-1	SCV	1988-02-18	1988-02-27	1988-02-27	+	10 <sup>6.0</sup>	1.0
	001-2	SCV	1988-02-18	1988-02-27	1988-02-27	+	10 <sup>6.0</sup>	1.0
	001-3	SCV	1988-02-18	1988-02-27	1988-02-27	+	10 <sup>6.0</sup>	1.0
	001-4	SCV	1988-02-18	1988-02-27	1988-02-27	+	10 <sup>6.0</sup>	1.0
Experiment 2	002-1	SCV	1988-02-18	1988-02-27	1988-02-27	+	10 <sup>6.0</sup>	1.0
	002-2	SCV	1988-02-18	1988-02-27	1988-02-27	+	10 <sup>6.0</sup>	1.0
	002-3	SCV	1988-02-18	1988-02-27	1988-02-27	+	10 <sup>6.0</sup>	1.0
	002-4	SCV	1988-02-18	1988-02-27	1988-02-27	+	10 <sup>6.0</sup>	1.0
Experiment 3	003-1	SCV	1988-02-18	1988-02-27	1988-02-27	+	10 <sup>6.0</sup>	1.0
	003-2	SCV	1988-02-18	1988-02-27	1988-02-27	+	10 <sup>6.0</sup>	1.0
	003-3	SCV	1988-02-18	1988-02-27	1988-02-27	+	10 <sup>6.0</sup>	1.0
	003-4	SCV	1988-02-18	1988-02-27	1988-02-27	+	10 <sup>6.0</sup>	1.0
Experiment 4	004-1	SCV	1988-02-18	1988-02-27	1988-02-27	+	10 <sup>6.0</sup>	1.0
	004-2	SCV	1988-02-18	1988-02-27	1988-02-27	+	10 <sup>6.0</sup>	1.0
	004-3	SCV	1988-02-18	1988-02-27	1988-02-27	+	10 <sup>6.0</sup>	1.0
	004-4	SCV	1988-02-18	1988-02-27	1988-02-27	+	10 <sup>6.0</sup>	1.0

### マーモセットにおける病理解析

マーモセットにおけるデングウイルスの病理解析

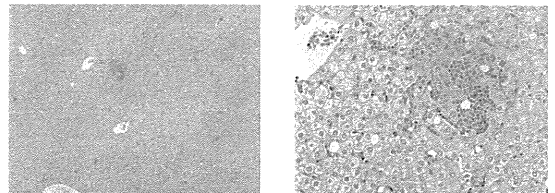
Marmoset Reference	Animal No.	Morbidity	Animal No.	肝臓				腎臓				脾臓				
				CP	CP2	CP3	CP4	CP1	CP2	CP3	CP4	CP1	CP2	CP3	CP4	
Experiment 1	001-1	+	001-1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	001-2	+	001-2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	001-3	+	001-3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	001-4	+	001-4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Experiment 2	002-1	+	002-1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	002-2	+	002-2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	002-3	+	002-3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	002-4	+	002-4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Experiment 3	003-1	+	003-1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	003-2	+	003-2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	003-3	+	003-3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	003-4	+	003-4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Experiment 4	004-1	+	004-1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	004-2	+	004-2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	004-3	+	004-3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	004-4	+	004-4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

#5075 病理(肝)



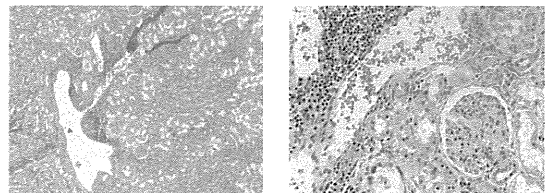
小葉中心性の鬱血、幹細胞の変性、Edema

#5156 病理(肝)



類洞へのリンパ球浸潤、脂肪化

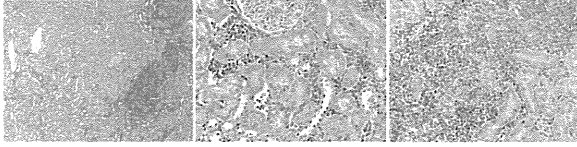
#5075 病理(腎)



中程度の間質性腎炎、鬱血著明、血栓形成

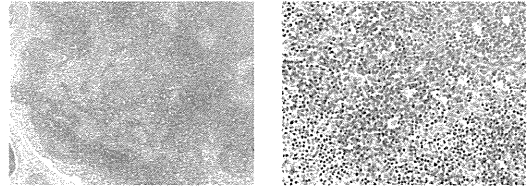


#5158 病理(腎臓)



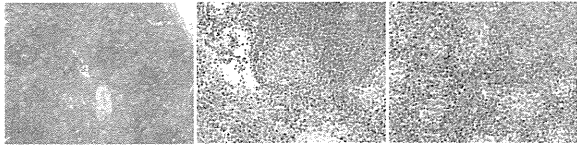
間質性腎炎、円柱、鬱血、組織破壊

#5075 病理(リンパ節)



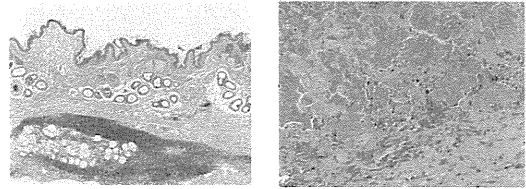
反応性腫大

#5077 病理(脾臓)



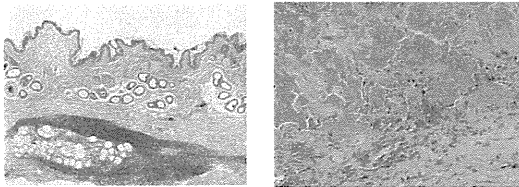
白脾髄の胚中心形成、白脾髄腫大、赤脾髄リンパ球増加

#5161 病理(皮膚)



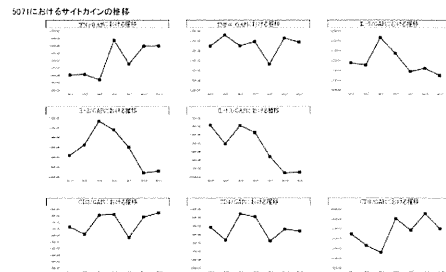
皮下血腫の散在、血栓を伴った拡張した静脈

#5161 病理(皮膚)



皮下血腫の散在、血栓を伴った拡張した静脈

マーマセット:5071個体におけるサイトカインに時系列な推移



厚生労働科学研究委託費  
新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業  
委託業務成果報告（業務項目）

（委託業務題目）

国内侵入・流行が危惧される昆虫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

担当責任者研究報告書

ロスリバーウイルスに対する日本産蚊の感受性と媒介能

担当責任者	江下優樹	大分大学医学部感染予防医学講座	准教授
研究協力者	福田昌子	大分大学医学部感染予防医学講座	助教
	Lucky R. Runtuwene	大分大学医学部感染予防医学講座	大学院生
	野口香緒里	大分大学医学部感染予防医学講座	大学院生
	小林隆志	大分大学医学部感染予防医学講座	教授
	Thipruethai Phanitchat	タイ国、マヒドン大学熱帯医学部	大学院生
	Raweewan Srisawat	タイ国、マヒドン大学熱帯医学部	科学者
	Narumon Komalamisra	タイ国、マヒドン大学熱帯医学部	准教授
	森田公一	長崎大学熱帯医学研究所	教授
	高崎智彦	国立感染症研究所ウイルス1部	室長
	倉根一郎	国立感染症研究所	副所長

研究要旨

海外からの帰国者がロスリバー熱に感染した症例が報告されたことから、国内に生息する蚊のロスリバーウイルスに対する感受性と媒介能について検討を行った。その結果、日本産ヒトスジシマカは、ロスリバーウイルスに対して感受性であり、媒介能を持つ事が明らかとなった。また、ヤマダシマカとリバーズシマカが本ウイルスに対して感受性であることが胸部接種法で明らかとなった。その中でも、ヤマダシマカは、ヒトスジシマカと同等の感受性があることが示唆された。今回の成績は、ロスリバー熱患者の国内勃発の際に、蚊対策に有用な情報となる。

A. 研究目的

2014年夏期の日本国内でのデング熱の勃発以来、チクングニア熱、ロスリバー熱などのアルボウイルス症の国内への侵入・流行が懸念されている。これらウイルスの主要な媒介蚊として、国内に生息するヒトスジシマカ

*albopictus* があげられる。本蚊種のウイルス媒介能を把握することは、媒介蚊対策を早期に行い、患者発生を未然に防ぐ方策につながる。この目的のために、本蚊種のこれらのロスリバーウイルス媒介能を検討した。

国内には、ヒトの生活と接点の多いヒトスジ

シマカ、ヒトスジシマカに混在して生息するヤマダシマカ *Aedes flavopictus*、および主に九州から沖縄の島々の主に森林内の樹洞内の水たまりで発生するリバーズシマカ *Aedes riversi* は、いずれも同じ *Aedes* (*Stegomyia*) の蚊種として分類されている。一般に、*Stegomyia* 亜属の蚊種がデングウイルスを媒介することから、チクングニアウイルスやロスリバーウイルスについても感受性を持つ事が推定されることから、これら蚊種のウイルス媒介能を検討した。

## B. 研究方法

### 1. 材料および方法

供試蚊： 福岡県久留米市で採集した久留米産と東京都渋谷区初台で採集したヒトスジシマカ、長崎県諫早市で採集したヤマダシマカ、鹿児島県奄美大島名瀬市で採集したリバーズシマカおよびリバプール系ネッタシマカ *Aedes aegypti* 雌成虫を使用した。なお、いずれの蚊も実験室内で継代されているものを用いた。

供試ウイルス： チクングニアウイルス (SL11131) は、レユニオン島由来で、患者から分離された株である。国立感染症研究所ウイルス1部の高崎智彦博士から、正式に分与されたものを用いた。実際の使用に際しては、C6/36細胞を使ってストックウイルスを作製して蚊の実験に供した。ロスリバーウイルス [MMNT-78, T48A1p(7dICF)] は、長崎大学熱帯医学研究所の森田公一博士から、正式に分与されたものを使用した。実際の使用に際しては、C6/36細胞を使ってストックウイルスを作成して蚊の実験に供した。

蚊への感染方法： 胸部接種法による感染では、接種装置を用いて、雌蚊の胸側部にウイルス液を接種した。その後、28°Cで飼育して所定日数後に、生存蚊のみをハーベストして、試験

まで-80°Cに保存した。また、経口感染法では、① 2 x 2 cm の無菌綿に所定のウイルス液を含ませて、蚊に3日間暴露させる方法、および、② Hemotek 装置を用いた膜 (ブタの腸) を介してウイルス液を吸液させる方法を行った。なお、②では、吸液時間を1時間としたが、その後3日間は、①の方法に従って同じウイルス液を3日間暴露して感染効率を高めた。

感染させた蚊は、28°Cで14日間飼育を行い、生存蚊のみを-80°Cに保存して、その後の実験に供した。

蚊からの RNA 精製： ペレットミキサーと2%MEMを用いて、個体毎に蚊の乳剤を作製した。その後、低速遠心した上澄み液を原液として、RNeasy Mini Kit (キアゲン) を用いて蚊から総 RNA を抽出・精製した。

RT-PCR： One-step RT-PCR キット (ライフテクノロジー社) を用いて、蚊の精製 RNA を鋳型にして、RT-PCR をマニュアルに従って実施した。なお、プライマーは、チクングニアウイルスゲノム特異的プライマー、あるいはロスリバーウイルス特異的プライマー配列を感染研の高崎博士から供与を受けた。

### (倫理面への配慮)

蚊のウイルス感染実験を行う際は、BSL3 実験室で実施した。実施に際しては、大分大学動物実験委員会から承認を得て開始した。

## C. 研究結果

### 1. 1 ロスリバーウイルスを雌蚊胸部に接種した際の日本産ヒトスジシマカ、ヤマダシマカ、リバーズシマカ、および外国産ネッタシマカの感受性

羽化5~8日後の上記4蚊種の雌成虫胸部にロスリバーウイルスのストックウイルスを約0.25 uL 接種した。28°Cで10日間飼育後の生存蚊から個別に総 RNA を抽出して RT-PCR を行

った。その後、アガロース電気泳動で得た結果を Fig. 1a に示した。RT-PCR で予想された増幅産物は 100bp であった (Fig. 1a のレーン 9)。その結果は、4 種の蚊で、ロスリバーウイルスゲノムの増幅が確認されたことから (Fig. 1a のレーン 1~8)、いずれの蚊種も本ウイルスに感受性を示すことが示唆された。また、定性的ではあるが、ヒトスジシマカおよびヤマダシマカはリバーズシマカよりもウイルスゲノムの増幅効率が高いことから、細胞の感受性に若干の差があることが推察された (Fig. 1b)。

#### 1. 2 ロスリバーウイルスを経口吸液した日本産ヒトスジシマカ雌成虫の感受性と媒介能

羽化 5~8 日後のヒトスジシマカ初台系の雌成虫にロスリバーウイルスのストックウイルスを経口投与した。Hemotek の膜を介してウイルス液を吸液する機会を 1 時間与えた。その後、ウイルス液を含む綿を介して吸液の機会を 28°C で 3 日間与え続けた。飼育は 1 日 16 時間照明の 28°C の恒温槽内で、4% 砂糖水を与えながら 14 日間飼育した。14 日経過後の生存蚊は、-80°C に保存したのちに、個別毎に脚を除いた組織から総 RNA を抽出して RT-PCR を行った。

アガロース電気泳動で得た結果を Fig. 2a に示した。RT-PCR で予想された増幅産物は 100bp であった (Fig. 2a のレーン 7)。ウイルス液単体を吸液した 3 個体の蚊 (Fig. 2a のレーン 1, 2, 3) あるいは、ウイルス液にアデノシン二リン酸を加えた液を吸液した 2 個体蚊 (Fig. 2a のレーン 4, 5) のうち、それぞれ 1 個体からロスリバーウイルスゲノムの増幅が認められた (Fig. 2a のレーン 2 と 5)。このことから日本産のヒトスジシマカは経口感染で本ウイルスに感受性があることが明らかとなった。また、個体数は少ないが、ウイルス液にアデノシン二リン酸を加えた液と加えない液とで、蚊から検出されるウイルスゲノムはほぼ同等と推定さ

れた (Fig. 2b)。

次に、Fig. 2a でウイルスゲノムが検出された個体の脚から抽出・精製した総 RNA を鋳型として、ロスリバーウイルス特異的プライマーを用いて RT-PCR を行った。その結果、いずれの個体の脚からも本ゲノム陽性のバンドが電気泳動で検出された (Fig. 3a)。このことから、中腸細胞で増殖したロスリバーウイルスは蚊の体腔内に放出されて、全身に拡散していることが推察され、唾液腺にも本ウイルスは到達していると想像される。また、脚から抽出したウイルスゲノムと脚以外から抽出したそれらの増幅程度を比較したところ、若干増幅程度は低い、ほぼ同程度の増幅であった。

#### D. 考察

日本産のヒトスジシマカは、ロスリバーウイルスに感受性があり、ウイルスを媒介する可能性が今回の実験で示唆された。

今回の胸部接種法による実験から、ヤマダシマカ、リバーズシマカに本ウイルス感受性があることが明らかとなった。両蚊種の媒介能を検討するためには、経口感染実験を今後検討する必要がある。

同じヒトスジシマカ群に属するヒトスジシマカ、ヤマダシマカ、及びリバーズシマカでは、いずれもウイルスの増殖は認められるが、リバーズシマカでは増殖が若干低いように思われた。今後、例数を増やす必要がある。

#### E. 結論

(1) 日本産ヒトスジシマカは、ロスリバーウイルスに対して感受性であり、媒介能を持つ事が明らかとなった。

(2) ヤマダシマカとリバーズシマカが本ウイルスに対して感受性であることが胸部接種法で明らかとなった。

(3) 日本産ヒトスジシマカとヤマダシマカの

本ウイルス増殖効率は、ほぼ同程度であり、リバーシマカのそれは若干低いことが胸部接種法の結果から示唆された。

#### F. 健康危険管理情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

(1) Lucky Ronald Runtuwene, Eiji Konishi, Atsushi Yamanaka, Yoshihiro Makino, Yutaka Suzuki, Tomohiko Takasaki, Ichiro Kurane, Takashi Kobayashi and Yuki Eshita (2014): Dengue transmission model by means of viremic adult immuno-competent mouse Parasit Vectors, 7:143. doi:10.1186/1756-3305-7-143

(2) Lucky Ronald Runtuwene, Kaori Noguchi, Akinori Tokunaga, Takashi Kobayashi, Kenta Nakai and Yuki Eshita (2014): Vector competence of *Aedes aegypti* to dengue virus. Urban Pest Management 4(1) : 1-14.

(3) Junya Yamagishi, Anna Natori, Mohammed E.M. Tolba, Arthur E. Mongan, Chihiro Sugimoto, Toshiaki Katayama, Shuichi Kawashima, Wojciech Makalowski, Ryuichiro Maeda, Yuki Eshita, Josef Tuda and Yutaka Suzuki (2014): Interactive transcriptome analysis of malaria patients and infecting *Plasmodium falciparum*. Genome Res., 24: 1433-1444,

(4) Jąkalski, Marcin; Wakaguri, Hiroyuki; Kischka, Tabea; Nishikawa, Yoshifumi; Kawazu, Shin-ichiro; Matsubayashi, Makoto; Kawahara, Fumiya; Tsuji, Naotoshi; Cao, Shinuo; Sunaga, Fujiko; Xuan, Xuenan; Okubo, Kazuhiro; Igarashi, Ikuo; Tuda, Josef; Mongan, Arthur; Eshita, Yuki; Maeda,

Ryuichiro; Makalowski, Wojciech; Suzuki, Yutaka; Yamagishi, Junya (2014) : DB-AT: a 2015 update to the Full-parasites database brings a multitude of new transcriptomic data for apicomplexan parasites. NAR-02635-Data-E-2014. R1 Nucleic Acid Res., 42(1) :D123-131.

##### 2. 学会発表

(1) 江下優樹, 福田昌子, Lucky Runtuwene, 大塚 靖, 野口香緒里, 川上絵理, 徳永暁憲, 小林隆志, 服部正策, Raweewan Srisawat, Narumon Komalamisra, 牛島廣治, 倉根一郎, 高崎智彦 (2014): 本邦産 *Aedes (Stegomyia) scutellaris* グループ蚊 2 種のチクングニアウイルス感受性(2)。第 66 回日本衛生動物学会大会、2014 年 3 月 21 日(金)・22(土)・23(日)、岐阜大学地域科学部、岐阜県岐阜市。Med. Entomol. Zool., 65 (大会特集号) :45, 2014

(2) Lucky R. Runtuwene, Shuichi Kawashima, Kaori Noguchi, Eri Kawakami, Akinori Tokunaga, Yutaka Suzuki, Sumio Sugano, Kenta Nakai, Ryuichiro Maeda, Chihiro Sugimoto, Tomohiko Takasaki, Ichiro Kurane, Takashi Kobayashi and Yuki Eshita (2014) : Utilization of CCL-125 for analyzing innate immunity in *Aedes aegypti*. 第 66 回日本衛生動物学会大会、2014 年 3 月 21 日(金)・22(土)・23(日)、岐阜大学地域科学部、岐阜県岐阜市。Med. Entomol. Zool., 65 (大会特集号) :46, 2014

(3) 三井マルセロ孝弘、藤田直子、宇佐川佑子、田村寛子、岩田敦子、岸 健志、江下優樹、小林隆志、西園晃、門田淳一(2014) : 病初期の IgM 迅速検査で陰性であった Dengue 熱の 1 例。第 62 回日本化学療法学会西日本支部総会、第 57 回日本感染症学会中日本地方会学術集会、第 84 回日本感染症学会西日本司法界学術集会合同開催。2014 年

10月23日(木)～25日(土)、岡山コンベンションセンター、岡山市。合同開催プログラム・抄録集2014: 378。(抄録番号234)

(4) 江下優樹, Lucky R. Runtuwene, 小西英二, 山中敦史, 牧野芳大, 野口香緒里, 川上絵理, 福田昌子, 小林隆志, Raweewan Srisawat, Narumon Komalamisra, 成田弘成, 牛島廣治, Arthur E. Mongan, 今田美穂子, 山岸潤也, 鈴木 穰, 中井謙太, 前田龍一郎, 杉本千尋, 倉根一郎, 高崎智彦 (2014): 一過性的にデングウイルス血症をマウスに起こして、定量的感染蚊を大量に作る新規の方法。第35回都市有害生物管理学会大会・総会、2014年6月27(金)・28(土)、日本大学生産工学部、千葉県習志野市。

(5) Lucky R. Runtuwene, Shuichi Kawashima, Kaori Noguchi, Yutaka Suzuki, Sumio Sugano, Kenta Nakai, Ryuichiro Maeda, Junya Yamagishi, Chihiro Sugimoto, Tomohiko Takasaki, Ichiro Kurane, Yuki Eshita and Takashi Kobayashi (2014): Potential novel anti-dengue virus in *Aedes aegypti* mosquito. The 37<sup>th</sup> Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan, Pacifico Yokohama,

Kanagawa Prefecture, November 25-27, 2014, MBSJ 2014 Program: 112. (Poster # 1P-0015)

(6) 岩中 愛, 松原祥恵, 福田昌子, Thipruethai Phanitchat, Raweewan Srisawat, Lucky R.

Runtuwene, 野口香緒里, Arthur E. Mongan, 鈴木 穰, Narumon Komalamisra, 成田弘成, 森田公一, 倉根一郎, 高崎智彦, 林田京子, 杉本千尋, 小林隆志, 江下優樹 (2014): RT-LAMP法の改良によるアルボウイルス症診断の検討。第26回日本環境動物昆虫学会年次大会、長崎大学大学教育学部、長崎市、11月29日(土)、30日(日)、第26回日本環境動物昆虫学会年次大会プログラム集 P-11。

#### 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

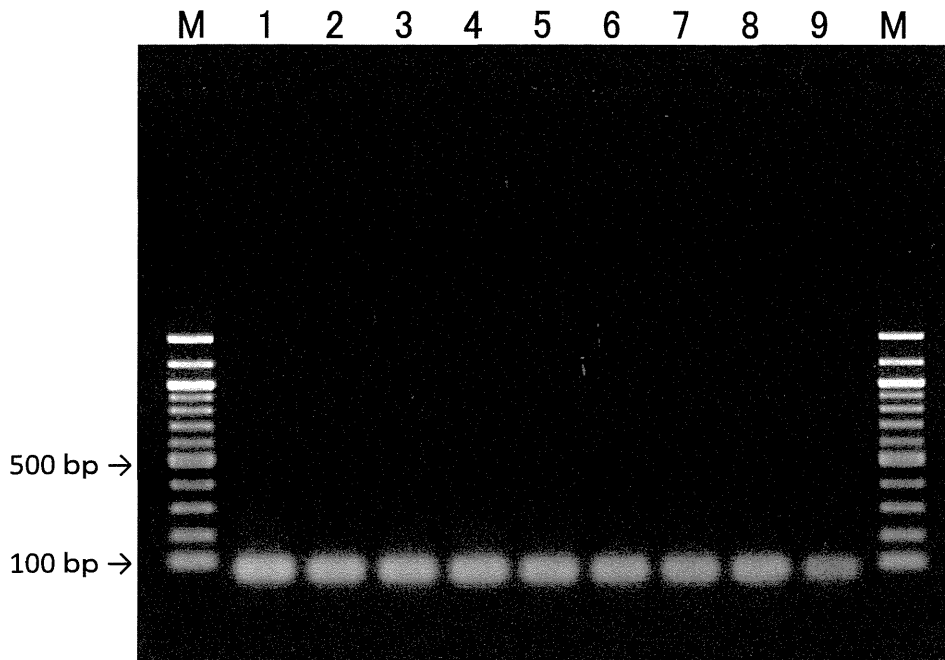
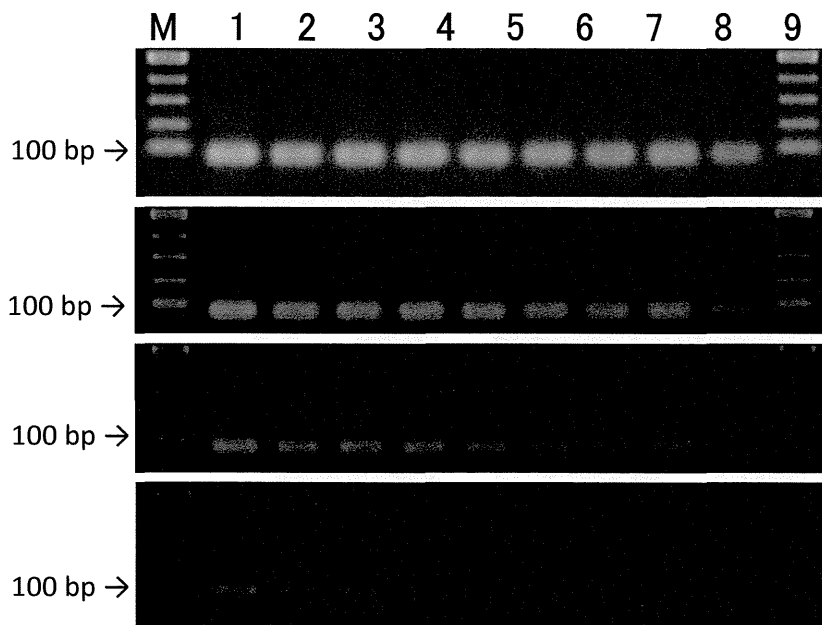


Fig. 1a Agarose gel electrophoresis of RT-PCR products originated from total RNA of intrathoracically Ross River virus-inoculated mosquitoes 10 days post infection at 28C.  
(M: 100 bp ladder marker, lanes 1-2: *Ae. albopictus* (Kurume), lanes 3-4: *Ae. flavopictus* (Nagasaki), lanes 5-6: *Ae. riversi*, lanes 7-8: *Ae. aegypti*, lane 9: Ross River viral RNA as positive control (141216-141226)  
(1.5% agarose in 1X TAE buffer, 4% Sucrose solution as a meal for female mosquitoes)



*Ae. albopictus* > *Ae. flavopictus* > *Ae. riversi*

Fig. 1b Agarose gel electrophoresis of RT-PCR products originated from total RNA of intrathoracically Ross River virus-inoculated mosquitoes 10 days post infection at 28C.  
(M: 100 bp ladder marker, lanes 1-2: *Ae. albopictus* (Kurume), lanes 3-4: *Ae. flavopictus* (Nagasaki), lanes 5-6: *Ae. riversi*, lanes 7-8: *Ae. aegypti*, lane 9: Ross River viral RNA as positive control (141216-141226)  
(1.5% agarose in 1X TAE buffer, 4% Sucrose solution as a meal for female mosquitoes)

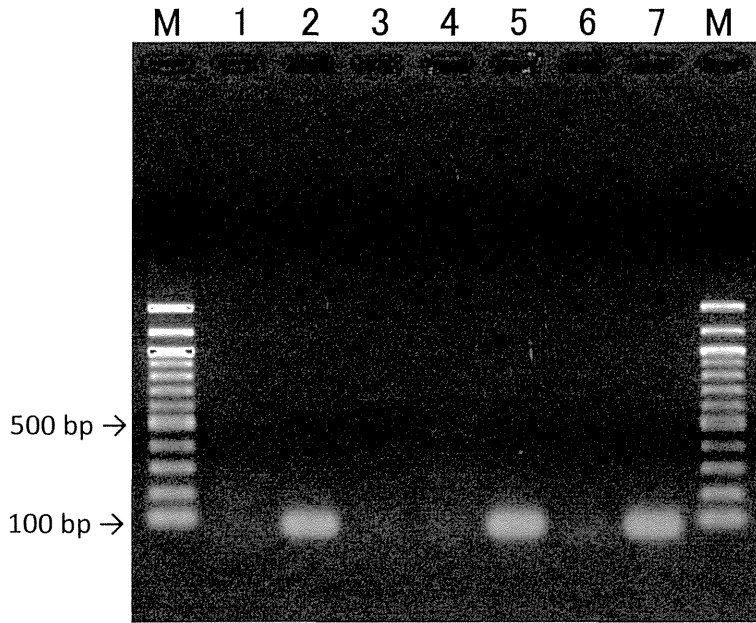


Fig. 2a Agarose gel electrophoresis of RT-PCR products originated from total RNA of orally Ross River virus-infected mosquitoes w/o legs, 14 days post infection at 28C (Hemotek membrane & 2% MEM-impregnated cotton (150120-150123)). (M: 100 bp ladder marker, lanes 1-5: *Ae. albopictus* (Hatsudai, Tokyo), lanes 1-3: RRV alone, lanes 4-5: RRV and Adenosine diphosphate (final concentration : 0.077 M) and lane 6: un-infected *Ae. albopictus* (Hatsudai) as negative control, lane 9: Ross River viral RNA as positive control (1.5% agarose in 1X TAE buffer, 4% Sucrose solution as a meal for female mosquitoes)

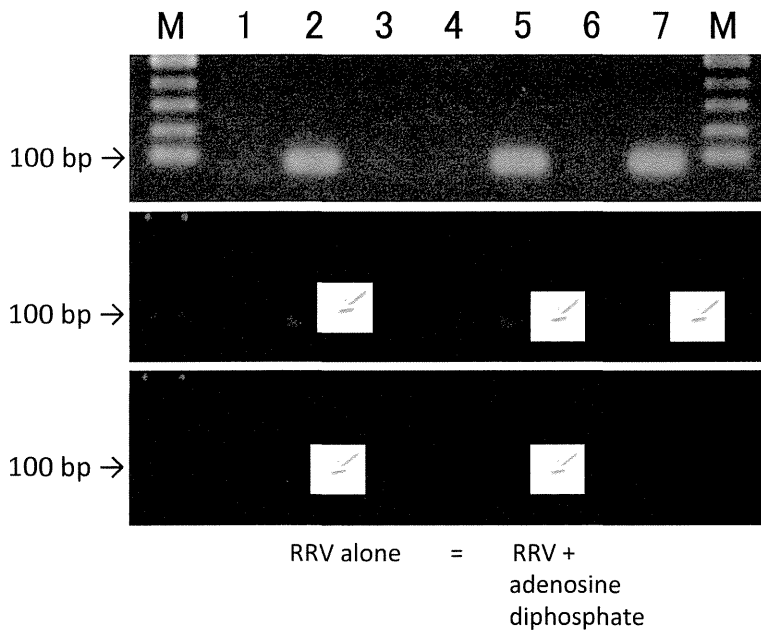


Fig. 2b Agarose gel electrophoresis of RT-PCR products originated from total RNA of orally Ross River virus-infected mosquitoes w/o legs, 14 days post infection at 28C (Hemotek membrane & 2% MEM-impregnated cotton (150120-150123)). (M: 100 bp ladder marker, lanes 1-5: *Ae. albopictus* (Hatsudai, Tokyo), lanes 1-3: RRV alone, lanes 4-5: RRV and adenosine diphosphate (final concentration : 0.077 M) and lane 6: un-infected *Ae. albopictus* (Hatsudai) as negative control, lane 9: Ross River viral RNA as positive control (1.5% agarose in 1X TAE buffer, 4% sucrose solution as a meal for female mosquitoes)



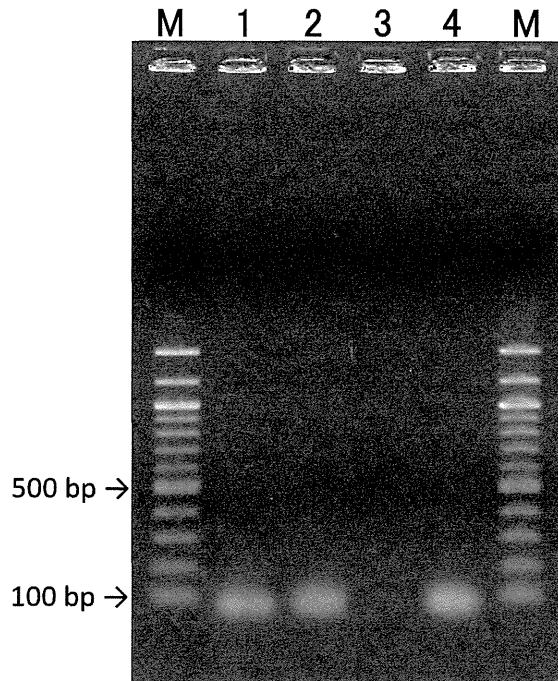
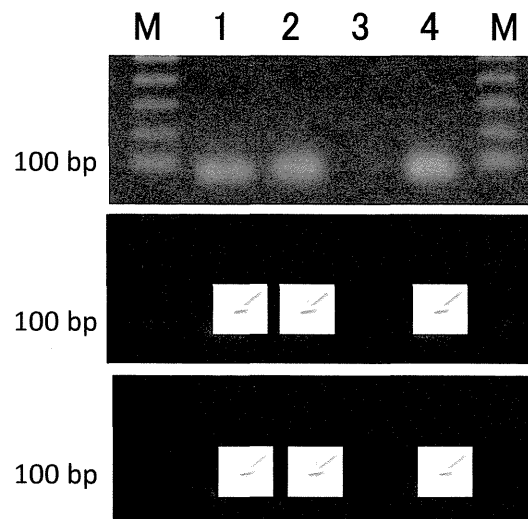


Fig. 3a Agarose gel electrophoresis of RT-PCR products originated from total RNA of orally Ross River virus-infected mosquito legs, 14 days post infection at 28C (Hemotek membrane & 2% MEM-impregnated cotton (150120-150123)).

(M: 100 bp ladder marker, lanes 1 & 2: *Aedes albopictus* (Hatsudai, Tokyo), lane 1: RRV alone, lane 2: RRV and 0.077 M adenosine diphosphate, and lane 3: un-infected *Ae. albopictus* (Hatsudai) as negative control, lane 4: Ross River viral RNA as positive control (1.5% agarose in 1X TAE buffer, 4% Sucrose solution as a meal for female mosquitoes)



*Ae. albopictus* = *Ae. albopictus*

Fig. 3b Agarose gel electrophoresis of RT-PCR products originated from total RNA of orally Ross River virus-infected mosquito legs, 14 days post infection at 28C (Hemotek membrane & 2% MEM-impregnated cotton (150120-150123)).

(M: 100 bp ladder marker, lanes 1 & 2: *Ae. albopictus* (Hatsudai, Tokyo), lane 1: RRV alone, lane 2: RRV and 0.077 M adenosine diphosphate, and lane 3: un-infected *Ae. albopictus* (Hatsudai) as negative control, lane 4: Ross River viral RNA as positive control (1.5% agarose in 1X TAE buffer, 4% Sucrose solution as a meal for female mosquitoes)

厚生労働科学研究委託費  
新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業  
委託業務成果報告（業務項目）

国内侵入・流行が危惧される昆虫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

担当責任者研究報告書

チクングニアウイルスレプリコンの設計および抗チクングニア剤評価のための  
霊長類モデルに関する検討

担当責任者 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）

白井頭治（筑波大学大学院人間総合科学研究科ウイルス医学）

ギジェルモ ポサダス・エレラ（国立感染症研究所ウイルス第一部第三室）

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

近年チクングニア熱が東南アジアからアフリカにかけて流行しているが、2013年末には西半球では初めてカリブ海諸島での流行が確認された、2014年にはアメリカ、メキシコ、ブラジル等の諸国に流行が拡大した。またイタリア（2007年）およびフランス（2010年）では温帯地域での流行も報告された。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。そこで本研究においてコモンマーモセットを用いた CHIKV 感染モデルの検討を行うと共に詳細な CHIKV の病態モデルの解析のためのレプリコンの設計を行った。CHIKV 接種マーモセットの血液に対する生化学的試験および病理学的解析を行った結果、CHIKV 接種 3-7 日後に AST, ALT, LDH の上昇が示され、肝機能障害が示唆された。さらに肝臓の病義学的解析において肝のシングルセルネクロシス、細胞浸潤が観察された。また肝臓において特異的抗原が検出された。これらの結果からマーモセットにおいて CHIKV の感染が成立したことが示された。

## A. 研究目的

チクングニアウイルス (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 ウイルスである。CHIKV はチクングニア熱の原因ウイルスであり、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*) などのヤブカ属の蚊によって媒介される。近年 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が、2013 年末には西半球では初めてカリブ海諸島で流行が確認された。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発熱、発疹、関節痛などのこれまでに知られているチクングニア熱の症状とは別に、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。我が国においても 2007 年より 2013 年末までに 72 例の輸入症例が確認された。チクングニア熱は日本周辺で大流行しており日本においても媒介蚊であるヒトスジシマカが存在するため国内侵淫の可能性は否定できない。しかしながらチクングニア熱の病態はいまだ不明な点が多い。そこで我々はマーモセットを用いた CHIKV 感染モデルの検討およびレプリコンを用いた病態解明モデルの設計を行ったので報告する。

## B. 研究方法

**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。麻酔は塩酸ケタミン+塩酸キシラジン混合麻酔

法により導入した。

**感染実験:** マーモセットに対して、SL10571 株 (500ul ;  $10^4$ - $10^8$  pfu/animal) を背側頸部に皮下接種した。感染 7 日後、10 日後、21 日後に安楽殺を行い各組織を採取した。

**血液生化学試験:** 採血した血液中の ALT (U/l), AST (U/l), LDH (U/l) の測定を行った。

**病理学的解析:** 採取した組織は 10%ホルマリンにて固定し、組織標本を作製した。作製した組織標本は HE 染色および抗 CHIKV マウス腹水を用いて免疫染色を行った。

**レプリコンの設計:** CHIKV レプリコンを設計するために GenBank 等より CHIKV の各種株の遺伝子配列を解析した。また、これまでに発表されているアルファウイルス、フラビウイルスのレプリコンを文献学的に解析した。

## C. 研究結果

**臨床症状:** 接種 3 日後より元気消沈、食欲減退を呈する個体が観察された。しかしながら発熱、体重減少は認められなかった。

**生化学試験:** 採血した血液中の ALT, AST, LDH の測定を行った結果、#5013 および #5014 のマーモセットにおいて ALT, AST, LDH の上昇が観察された、#5016 のマーモセットにおいて AST, LDH の上昇が認められた。#5015 および陰性対照である #5017 においては特異的上昇は認められなかった。

**病理学的解析:** 採取した各組織の病理解

析を行った結果、#5013 の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、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。#5014 の肝臓においては肝細胞、kupper 細胞に特異的抗原が観察された。#5015 の肝臓においては類洞内への細胞浸潤が観察され、kupper 細胞に特異的抗原が観察された。#5016 の肝臓においても細胞浸潤が観察されたが、特異的抗原は認められなかった。対照個体である#5017 の肝臓において病理学的変化は認められなかった。

レプリコンの設計：文献学的にこれまでに発表されているアルファウイルスおよびフラビウイルスレプリコンを解析した結果、これまでに国内で分離された CHIKV 株 SL11131 株をベースにして CHIKV レプリコンを作製することにした。ところで野生株から作製されたレプリコンは細胞毒性を有し、そのレプリコンを導入された宿主細胞は死滅する。これは主にウイルスの非構造タンパク質である nsP2 が原因である。これまでに nsP2 の毒性を低下させるためには、P718G の変異体を導入することが有効であると報告されているため、P718G 変異を導入したレプリコンを設計した。

#### D. 考察

CHIKV 接種3日後から AST, LDH の上昇が、接種4日後から ALT の上昇が観察され、CHIKV 接種による肝機能障害が示された。また CHIKV 接種3, 7, 10, 21 日後に安楽殺を行いコモンマーモ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。その結果、肝臓においては肝細胞における特異的抗原の観察、肝のシングルセルネクローシス、細胞浸

潤が観察されたことから CHIKV の感染が成立したことが示されたと考えられた。今後レプリコンを用いた CHIKV の病態、感染機構の解明、ウイルス学および病理学的解析を行う必要がある。

#### 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は今後も流行が続くことが予想される。また西半球においても小流行が発生しており、今後も注視する必要がある。したがって日本においても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り、早期のチクングニア熱の動物実験モデルの開発はその病態解明および将来のワクチン開発、病態生理に基づく新治療法の開発に資する。

#### F. 健康危険情報

特記事項なし

#### G. 研究発表

特記事項なし

#### H. 学会発表

- 1) Moi ML, 白石健二、網康至、宮田幸長、林昌宏、須崎百合子、北浦孝一、西條政幸、鈴木隆二、倉根一郎、高崎智彦。

Demonstration of common marmosets (*Callithrix jacchus*) as a non-human primate model for dengue vaccine development. 第62回日本ウイルス学会学術集会。横浜, 2014年11月10-12日。

- 2) 齋藤悠香、Moi ML、竹下望、林昌宏、司馬