

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

(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

研究分担者 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 Fc $\gamma$ R 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、マーマセッ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、マーマセッ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ッ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:** マーマセット 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ット 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。再感染のマーマセッ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, Suzuki 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):103-16, 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. マレー溪谷脳炎ウイルス. 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