

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班

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

分担研究者	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・マイリン	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 日まで続いた。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。④126~92 週後に再感染した群で炎症性細胞浸潤が高度である。⑤41 週後に再感染した群では、炎症性細胞浸潤が軽度である。⑥75 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。⑦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

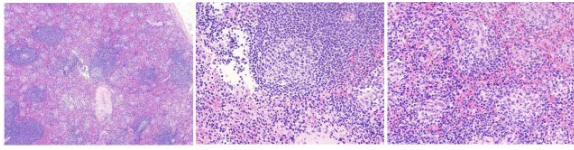
Shirai K, Hayasaka D, Kitaura K, Takasaki T, Morita K, Suzuki R, Kurane I.

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

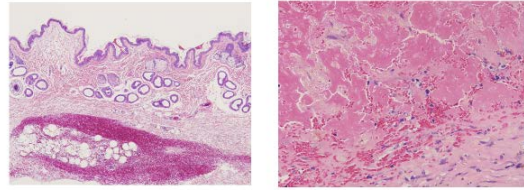


#5077 病理(脾臓)



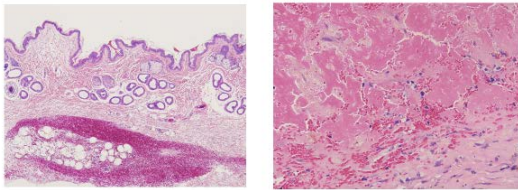
白脾髄の胚中心形成、白脾髄腫大、赤脾髄リンパ球増加

#5161 病理(皮膚)



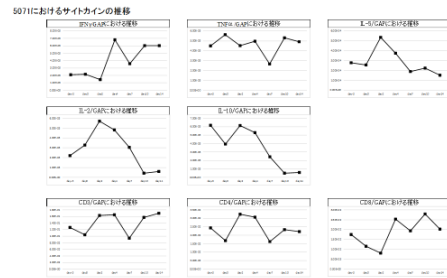
皮下血腫の散在、血栓を伴った拡張した静脈

#5161 病理(皮膚)

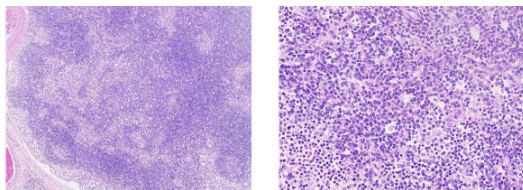


皮下血腫の散在、血栓を伴った拡張した静脈

マーモセット:5071個体におけるサイトカインに時系列な推移



#5075 病理(リンパ節)



反応性腫大