

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

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

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

分担研究者 倉根一郎（国立感染症研究所副所長）
協力研究者 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）
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*) などのヤブカ属のカ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、司馬肇、細野邦明、西條政幸、倉根一郎、高崎智彦。 Fc γ R 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被接種者におけるデングウイルスに対する中和・感染増強能の検討。 第 62 回日本ウイルス学会学術集会。横浜, 2014 年 11 月 10-12 日。

- 3) 山口幸恵、林昌宏、伊藤（高山）睦代、垣内五月、堀谷まどか、田島茂、高崎智彦、倉根一郎、渡邊治雄、西條政幸. 日本脳炎ウイルスの神経侵襲性決定に関与する炎症性サイトカインの解析。第 62 回日本ウ

イルス学会学術集会. 横浜, 2014 年 11 月
10-12 日.

I. 知的財産権の出願・登録状況
特記事項なし

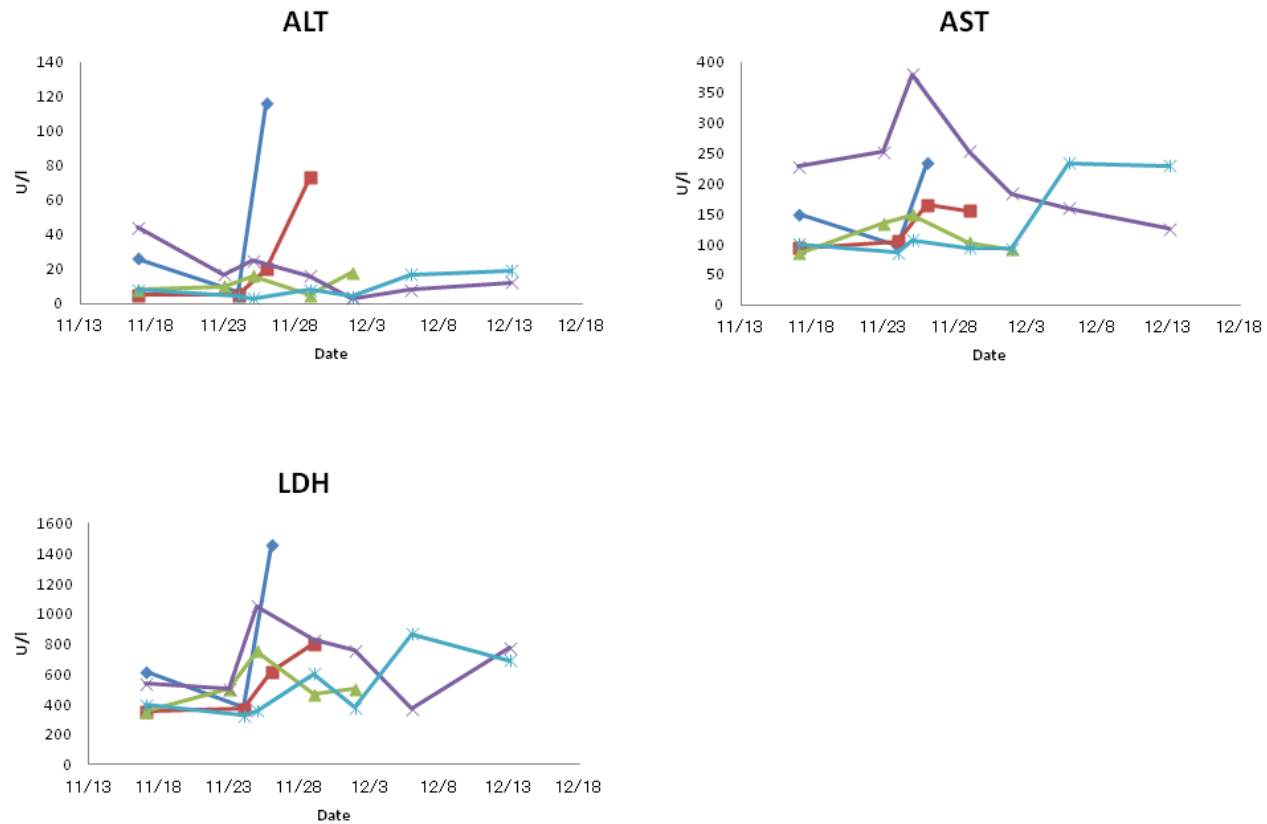


図 1 コモンマーモセットの血液生化学検査：マーモセットに対して，CHIK SL10571 株を背側頸部に皮下接種した，#5013 (◆)，#5014 (■)，#5015 (▲)，#5016 (×)，#5017 (※)．その結果接種 3 日後から AST と LDH の上昇が #5013，#5014，#5016 において観察された．また接種 4 日後からは ALT の上昇が #5013，#5014 において確認された．対照個

体（#5017）においては ALT, AST, LDH の上昇は観察されなかった。