

研究種目：若手研究（スタートアップ）
 研究期間：平成19年度～平成20年度
 課題番号：19890279
 研究課題名（和文） 免疫機能正常マウスを用いたデング出血熱発症モデルの開発および発症機序の解明
 研究課題名（英文） The development of Dengue hemorrhagic fever model using Immunocompetent mouse and the study on the mechanism of Dengue diseases pathogenesis
 研究代表者 大松 勉
 国立感染症研究所・ウイルス第一部・研究員
 (研究者番号：60455392)

研究成果の概要：本研究では、免疫機能正常マウスを用いたデング出血熱発症モデルの開発における基礎データとして、マウス由来細胞において増殖能の高いウイルスおよび、よりデングウイルス増幅能の高いマウス由来細胞株の選定を行った。さらに、新たにマーモセットのデングウイルスに対する感受性を検索したところ、他の霊長類事件動物に比べ高い感受性を有し、時に発熱などの臨床症状を呈することが示された。また、感染マーモセットより分離されたウイルスにおいてはこれまでに検索した全ての分離株に共通のアミノ酸変異を伴う点変異が非構造蛋白質コード領域に認められた。これらの結果を踏まえ、今後デング出血熱発症モデルの構築を進め、その発症機序の解明を行っていききたい。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成19年度	1,320,000	0	1,320,000
平成20年度	1,350,000	0	1,350,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,670,000	0	2,670,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：ウイルス学

キーワード：デングウイルス、デング熱・デング出血熱、免疫正常マウス、マーモセット、NS4B

1. 研究開始当初の背景

デングウイルスはフラビウイルス科に属し、蚊の吸血によりヒトからヒトへと感染が広がるウイルスである。デングウイルス感染による症状としては、急性熱性疾患であるデング熱から適切な治療が行われな

った場合には致死的となるデング出血熱までと幅広い。デングウイルスは熱帯から亜熱帯にかけて広く分布しており、近年では年間約一億人にも上る感染者を出しそのうち約数十万人がデング出血熱を発症している。日本においても輸入症例として報告さ

れ、2008年は100例に達した。世界的に見ても温暖化等によるウイルス媒介蚊の生息地域拡大に伴うと考えられる報告例の増加も見られおり、蚊媒介性ウイルスの中で最も重要なウイルスとなっている。

デングウイルスには1型から4型までの四つの血清型があるが、それぞれ異なるウイルスである。一つの型に感染した場合、その型に対する終生免疫は獲得されるが他の型に対する免疫は数カ月で消失するため、他の型のウイルス感染が起きた場合には再度発症し得る。これまでデング出血熱患者の多くは初感染と異なる血清型のデングウイルスの再感染であったことから、初感染時に産生された抗デングウイルス抗体による感染増強が生じたことにより、血漿漏出を主症状とするデング出血熱が引き起こされたと考えられた。この感染増強現象は細胞レベルからサルを用いた個体レベルでの感染実験でも確認されている。また、この感染増強によりT細胞活性の増強に伴う大量のサイトカイン産生を引き起こし、血管内皮の機能異常を引き起こすと可能性も考えられており、これらを中心とした研究が欧米を中心としたいくつかの研究室でおこなわれてきているものの出血熱発症への関与は未だ明らかになってはいない。また、国内でもいくつかの研究室が米国の研究所から譲渡されたクローンを使用し研究を進めているが、様々な制約があるためあまり進んではいない。一方、初感染時における出血熱様症状発症の報告もあり、ウイルス自体の遺伝子変異に伴う症状多様化の可能性も否定できない。いずれの説にしても、ウイルスが高度に増殖する状態が出血熱発生の主要因として考えられるが、実際の発症メカニズムに関してはいまだ明確な答えは出ていない。この原因の一つとして、適切な発症モデルが存在しないことが挙げられる。マウスなどの実験動物に対する感染実験においては、感染は成立するものの血漿漏出などの出血熱様症状が認められず、実験動物を用いた病態解析は不可能であった。また、感染成立の報告に用いられているマウスは免疫機能に障害を有するマウスであり、免疫機能が大きく関与すると考えられている出血熱様症状の発症機序の解析には適していないと言える。この様に、出血熱発症モデルの欠落はその発症機序の解析を進める上で非常に大きな障害となっていた。

2. 研究の目的

免疫機能がデング出血熱の発症に大きく関与するということが近年明らかになってきた。そこで申請者は、(1) マウス由来細胞適応デングウイルス株の作製、(2) それを用いた免疫機能正常マウスを用いたデング出血熱モデルの構築、さらに(3) 発症機序の解

明を目的として以下の研究を行った。

さらに、新たなモデル動物の検索として新世界ザルに属するマーモセットの感受性についての検討も行った。

3. 研究の方法

(1). マウス由来細胞適応デングウイルス株の作製

デング熱患者由来1型デングウイルスのクローン由来ウイルス (DENV-1/02-20 株)、およびデング出血熱患者より分離された2型デングウイルス (DENV-2/DHF0663 株) をマウス肝臓由来 Hepa1-6 細胞、マウス神経芽細胞腫 N18 細胞およびマウスマクロファージ様細胞 RAW264 細胞に M.O.I = 0.1 で感染させ、培養上清中のウイルス RNA 量を TaqMan RT-PCR を用いて経時的に定量しそれぞれの感受性について検索を行った。

(2). マーモセットのデングウイルスに対する感受性について

4 頭のマーモセットに対してデング熱およびデング出血熱患者より分離した1型デングウイルス (DENV-1/02-17/1 株)、2型デングウイルス (DENV-2/DHF0663 株)、3型デングウイルス (DENV-3/DSS1403 株) および4型デングウイルス (DENV-4/05-40/1 株) をそれぞれ 3.5×10^7 pfu/animal、 6.7×10^7 pfu/animal、 4.5×10^6 pfu/animal、 1.5×10^6 pfu/animal ずつ皮下接種し、接種前および接種後 3、7、14 日目に採血を行い、血中ウイルス RNA 量を TaqMan RT-PCR を用いて定量し、感受性を検索した。さらに MAC-ELISA および Indirect ELISA により DENV-specific IgM および IgG の変動を検索した。また、尿中からもウイルス RNA の検出を試みた。

(3). マーモセット体内における2型デングウイルス増殖能および臨床症状の検索

4.4×10^7 pfu/animals、 1.8×10^5 pfu/animals、 10^4 pfu/animals のデング出血熱患者由来2型デングウイルス (DENV-2/DHF0663 株) を各2頭ずつのマーモセットに皮下接種し、接種前および接種後 3、7、14、21 日目に採血を行い TaqMan RT-PCR による血中ウイルス量の定量、ELISA を用いた DENV-specific IgM および IgG の変動を検索した。さらに腹腔内にテレメーターを挿入し、体温変動および活動量について検索を行った。

(4). マーモセットへの適応に関与するウイルス側因子の検索

2型デングウイルスを接種したマーモセットの接種3日目もしくは4日目の血漿より

C6/36 細胞を用いてウイルスを分離し、その遺伝学的な検索を行った。

4. 研究成果

(1). マウス由来細胞適応デングウイルス株の作製

DENV-1/02-20 および DENV-2/DHF0663 を各マウス由来細胞に感染させた結果、ともに Hepa1-6 細胞において接種 4 日目まで培養上清中のウイルス RNA 量の増加が認められた。また、デング出血熱患者由来ウイルスである DENV-2 の方がマウス由来細胞におけるウイルスの増殖性が高いことが示された。今後、DENV-2/DHF0663 を RAW264 で Passage することにより、マウス由来細胞でも増殖能を有するデングウイルス株の作製を試みる。

(2). マーモセットのデングウイルスに対する感受性について

1 型から 4 型までのデングウイルスを接種したマーモセットの血中からはウイルス RNA が検出され、1 型・3 型ウイルス接種個体では接種後 5 日目を、2 型・4 型ウイルス接種個体では接種 3 日目をピークとするウイルス血症が認められた。全ての個体で 7 日目にはウイルス RNA は消失していた。また、ウイルス増殖マーカーである NS1 抗原については 2 型、3 型接種個体では接種 3 日目をピークとして 7 日目まで認められ、1 型接種個体では 3 日目から 10 日目まで高い濃度で認められた。DENV-specific IgM 抗体は 1 型、2 型、3 型接種個体では接種後 5 日目から陽転し 10 日目をピークとする上昇が認められた。4 型接種個体は、接種 7 日目から上昇が認められた。DENV-specific IgG 抗体は全ての個体で接種後 10 日目から上昇が認められた。また、2 型デングウイルス接種個体では、接種後 4 日目、5 日目に肉眼的血尿が認められ、2 型、3 型デングウイルス接種個体の尿からはウイルス RNA が検出された。このことから、デングウイルスはマーモセット体内で増殖可能であることが示唆された。

(3). マーモセット体内における 2 型デングウイルス増殖能および臨床症状の検索

2 種類の濃度の 2 型デングウイルスを皮下接種したところ 10^5 pfu/animal においても 10^7 pfu/animal とほぼ同レベルのウイルス血症が接種後 3 日目をピークとして認められた。また、DENV-specific IgM 抗体は接種 7 日目から認められ 14 日にピークがみられた。また、DENV-specific IgG 抗体は接種後 14 日目から上昇が認められた。これら 4 個体のうち 3 個体において有意な体温上昇が認められた。個体 #1 においては、接種後 1、6、7、13 日目に、#3 においては接種後 2、3、5 日

目に、#4 においては接種後 1 日目から 7 日目にかけて認められた。また、有意な活動量の低下は 4 個体中 3 個体で認められた。個体 #1 においては、接種後 1 日目から 3 日目、#2 においては接種後 1 日目から 14 日目、#3 においては接種後 3 日目から 15 日目にかけて認められた。このことから、2 型デングウイルスはマーモセット体内で増殖し抗体誘導等を引き起こすと共に、個体差は見られるものの発熱などの臨床症状も呈することが明らかとなった。

(4). マーモセットへの適応に関与するウイルス側因子の検索

2 型デングウイルスを接種したマーモセット 3 個体の接種後 3 日目の血漿より C6/36 細胞を用いてウイルス分離を行い、全遺伝子の塩基配列を決定した。その結果、アミノ酸変異を伴う遺伝子変異が非構造蛋白質の NS4B 領域に認められ、これは分離ウイルス 3 株全てに共通に認められた。このことから、非構造蛋白質である NS4B はヒトとマーモセットの種差を超えるのに関与する可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 5 件)

(1). 大松勉、名和優
デング熱
診断と治療. 査読無
2009;97(3):551-555

(2). Kuraoka M, Furuta T, Matsuwaki T, Omatsu T, Ishii Y, Kyuwa S, Yoshikawa Y.
Direct experimental occlusion of the distal middle cerebral artery induces high reproducibility of brain ischemia in mice. *Experimental Animals*. 査読有
2009;58(1):19-29.

(3). Watanabe S, Omatsu T, Miranda ME, Masangkay JS, Ueda N, Endo M, Kato K, Tohya Y, Yoshikawa Y, Akashi H.
Epizootology and experimental infection of Yokose virus in bats. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*. 査読有
2008. [Epub ahead of print]

(4). Omatsu T, Bak EJ, Ishii Y, Kyuwa S, Tohya Y, Akashi H, Yoshikawa Y.

Induction and sequencing of Roussette bat interferon alpha and beta genes. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 査読有
2008;124(1-2):169-76

(5). Omatsu T, Watanabe S, Akashi H, Yoshikawa Y.
Biological characters of bats in relation to natural reservoir of emerging viruses. *Comparative immunology, Microbiology and Infectious Diseases*. 査読有
2007;30(5-6):357-74

〔学会発表〕(計 6 件)

(1). 大松勉、平山隆則、小滝徹、伊藤美佳子、片貝祐子、中村紳一朗、明里宏文、高崎智彦、倉根一郎
霊長類を用いたデングウイルス感染モデルの構築
第 56 回日本ウイルス学会:2008 年 11 月:岡山

(2). 大松勉、渡辺俊平、上田直也、伊波興一郎、Joseph S. Masangkay、明石博臣、吉川泰弘、高崎智彦、倉根一郎
フィリピンのコウモリにおけるアルボウイルス暴露について
第 43 回日本脳炎ウイルス生態学研究会:2008 年 5 月:香川

(3). 伊波興一郎、大松勉、渡辺俊平、上田直也、谷口怜、石井寿幸、久和茂、明石博臣、吉川泰弘
翼手目の Toll-like receptor (TLR) 3, 7, 9 の cDNA 塩基配列解析および臓器別 mRNA 発現量の解析
第 147 回日本獣医学会:2009 年 4 月:栃木

(4). 上田直也、大松勉、渡辺俊平、伊波興一郎、由井志乃ぶ、鈴木聡、佐藤哲男、濱崎裕子、石井寿幸、遠矢幸伸、久和茂、明石博臣、吉川泰弘
コウモリ CYP1A の特性
第 146 回日本獣医学会:2008 年 9 月:宮崎

(5). 大松勉、倉根一郎、高崎智彦
IgG capture ELISA 法を用いたベネズエラウマ脳炎診断法の開発
第 14 回トガ・フラビ・ペスチウイルス研究会:2007 年 10 月:北海道

(6). 渡辺俊平、大松勉、上田直也、加藤健太郎、遠矢幸伸、吉川泰弘、明石博臣
オオコウモリを用いた Yokose virus の感染実験
第 55 回日本ウイルス学会:2007 年 10 月:北海

道

〔図書〕(計 0 件)

なし

〔産業財産権〕
○出願状況(計 0 件)

なし

○取得状況(計 0 件)

なし

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大松 勉 (Omatsu Tsutomu)

国立感染症研究所・ウイルス第一部・研究員
研究者番号: 60455392

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

