

平成 27 年 10 月 13 日現在

機関番号：82603

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590564

研究課題名(和文) 霊長類モデルを用いたチクングニアウイルス感染病態解析

研究課題名(英文) Primate model and pathological analysis for Chikungunya virus infection

研究代表者

高崎 智彦 (Takasaki, Tomohiko)

国立感染症研究所・その他部局等・その他

研究者番号：20221351

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：デング熱の媒介蚊でもあるヒトスジシマカにより媒介されるチクングニアウイルス(CHIKV)の霊長類マーモセットへの感染が成立することを確認し、ワクチンや抗ウイルス薬評価が可能なウイルス血症を来とし、接種3-7日後に肝酵素の上昇が示され、病理学的解析で肝臓に炎症所見を認め、kupper細胞にCHIKV特異的抗原が観察された。しかし、チクングニア熱に特徴的な関節炎症状を来たすことはなかったため、易感染性のIFNaR1欠損マウスにCHIKVの接種を試みたところ、関節を含む全身臓器でのウイルス増殖が観察され、CHIKV感染による関節炎の病態解析には、動物の遺伝子改変操作の必要性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Chikungunya virus is transmitted by Aedes albopictus same as dengue viruses. Marmoset could be infected with chikungunya virus and showed viremia and liver dysfunction. The viremia levels were enough to evaluate vaccine candidates and anti chikungunya viral drugs. Liver dysfunction were observed and viral antigens were identified in kupper cells of marmosets infected with chikungunya viruses. However any arthritis were not observed in the marmosets. We confirmed IFNaR1 knock out mice infected with chikungunya viruses were shown arthritis. Genetically modified animals might be necessary to occur arthritis same as human chikungunya fever.

研究分野：ウイルス学

キーワード：チクングニアウイルス マーモセット 関節炎 肝機能障害 免疫不全マウス ウイルス遺伝子

### 1. 研究開始当初の背景

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のウイルスであり、蚊を媒介としてヒトにデング熱様の発熱性疾患を引き起こす。デングウイルスのような中央/東アフリカ型、西アフリカ型、アジア型の遺伝子型は存在するが、単一血清型で、従来は非致死性の感染症と考えられていた。しかし、2004年ラム島に端を発し2005年に西インド洋島嶼国において大きな流行を引き起こした流行株は、レユニオン島で約25万人の患者が報告され、そのうち213人が肝炎、心筋炎、脳症などで死亡した。その後この西インド洋諸国の流行は、インド、スリランカに拡大し現在マレーシア、シンガポール、タイ、インドネシアなど東南アジアに流行が拡大している。CHIKVの媒介蚊は、ネッタイシマカとヒトスジシマカであるが、この2種類のうち今回の流行株は、E1エンベロップ蛋白の1塩基多型(A226V)の結果ヒトスジシマカにおける増殖能力がより高まったCHIKVである。2007年にインドからのチクングニア熱(CHIKF)1輸入症例に端を発した北部イタリアの国内流行では、約300人の患者が発生し1死亡例が報告された。当該地域にはネッタイシマカは生息せずヒトスジシマカによる流行であった。また、2010年にはやはりヒトスジシマカが生息するフランス南部においても国内流行が確認されている。北海道を除く日本におけるヒトスジシマカは5月から11月にかけて活発に活動しており、CHIKVの国内侵入に備える意味からも、本ウイルスに関する研究は重要である。特にチクングニア熱は関節炎を起こすことが多く、急性症状が治まったのちも関節症状は持続し、時に関節リウマチ様の後遺症を残すこともある。CHIKV特異的治療薬はなく、ワクチンも未だ実用化に至っていない。世界的な拡大と流行の可能性があり、CHIKV感染者の多くが慢性的な運動器症候を示す危険に曝されていることは深刻な脅威である。しかし、CHIKV感染患者のいずれかがCHIKFを発症するのかについては、ウイルス側や生体免疫側に立脚した研究でも十分に解明されていない。一部の感染者のみに何故、重篤で致死的な病態が起こるのか(多くは不顕性感染である)それが生体内の如何なる因子に起因するかを明らかにする事が重要である。本研究では、CHIKV感染動物モデルを確立し、CHIKV特異的T細胞に主眼を置いた研究を推進することからCHIKV感染防御や重篤なCHIKF発症メカニズムを解明する。その成果をCHIKV感染症に対する予防や治療に資することを目的とした。

### 2. 研究の目的

近年チクングニアウイルス(Chikungunya

virus: 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、2013年にはカリブ海諸国に侵入し、2014年フロリダおよび南米大陸に侵入した。我が国においても感染症法に収載後、毎年十数例の輸入症例が報告されている。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ウイルスであり、チクングニア熱の原因ウイルスである。CHIKVは昆虫媒介性ウイルスであり、その媒介蚊はネッタイシマカ(*Aedes aegypti*)や日本にも広範囲に生息するヒトスジシマカ(*Aedes albopictus*)というヤブカ属の力で、デングウイルス媒介蚊と同じ力である。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が存在するため国内侵入の可能性は否定できない。また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。したがってチクングニア熱の病態はいまだ不明である。ところで近年コモンマーモセット(マーモセット)が新たな霊長類モデルとして注目されている。マーモセットは、南米の熱帯雨林に生息する霊長目オマキザル科マーモセット属の新世界ザルであり、繁殖効率が高く、小型で実験上取り扱いが容易である。実験動物としてのコロニーが存在するため、性別、年齢、体重などをコントロール群、実験群で複数匹揃え、繰り返し実験を行う事が可能である。

我々はマーモセットおよびIFNaR1欠損マウスに対する感染性を用いたCHIKV感染モデルの検討を行いCHIKV接種マーモセットに対する病態解析を行うことである。

### 3. 研究の方法

・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。

・動物:体重300g~379g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。また、IFNaR1欠損マウスに対する感染性も検討した。

・感染実験1:マーモセット6頭に対して、SL10571株(500ul; 10<sup>8</sup>pfu/animal)を背側頸部に皮下接種した。感染4日後(#5013)、7日後(#5014)、10日後(#5015)、21日後(#5016)に安楽殺し各組織を採取した。またマーモセット1頭を対照個体(#5017)として供試した。

・ウイルス学的解析:採取した組織よりウイルス遺伝子を抽出し、TaqManリアルタイムRT-PCR法により組織中のウイルス遺伝子量を検出した。

#### 4. 研究成果

(1)チクングニアウイルス感染マーマセットの組織中のCHIKV RNA量の検討：採取した組織よりRNAを抽出し、各組織におけるCHIKVのRNAコピー数をTaqMan RT-PCR法により計測した。その結果脾臓、腋窩リンパ節においてウイルスRNAが検出された。脊髄、大腿筋、心筋、大脳、小脳、肺からはウイルスRNAは検出されなかった。また対照個体である#5017からはウイルスRNAは検出されなかった。

(2)IFNaR1欠損マウスに対する感染では、致死感染を起こし、関節を含む全身臓器でのウイルス増殖が観察された。

表1

臓器	Days post inoculation			
	4	7	10	21
脾臓	+	+	+	+
腋窩リンパ節	+	+	ND	+
脊髄	ND	-	-	-

ND:検出せず、-;実施せず

(3)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のマーマ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。また脾臓においては二次濾胞の形成が観察された。#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。また脾臓においては二次濾胞においてstarry sky像が観察された。#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の肝臓および脾臓において病理学的変化は認められなかった。

図2 病理所見（写真は最終ページに掲載）

#### コモンマーマセットの肝臓における病理像

：チクングニアウイルスを背側頸部に皮下接種したマーマセット4頭において、接種4日後のHE像(A)において細胞浸潤、免疫染色像(B)において特異的ウイルス抗原が観察された。また10日後のHE像(C)においても細胞浸潤像、免疫染色像(D)において特異的抗原が観察された。対照個体(E)においては病理学的変化が観察されなかった。

#### 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2件)

Fujii Y, Kitaura K, Matsutani T, Shirai K, Suzuki RS, Takasaki T, Kumagai K, Kametani Y, Shiina T, Takabayashi S, Katoh H, Hamada Y, Kurane I, Suzuki R.: Immune-related gene expression profile in

laboratory common marmosets assessed by an accurate quantitative real-time PCR using selected reference genes. Plos One. 2013 Oct 3;8(10):e76385.

Kitaura K, Fujii Y, Matsutani T, Shirai K, Suzuki S, Takasaki T, Shimada S, Kametani Y, Shiina T, Takabayashi S, Katoh H, Kurane I, Suzuki R.: A new method for quantitative analysis of the T cell receptor V region repertoires in healthy common marmosets by microplate hybridization assay. J Immunol Methods. 2012 Oct 31;352(29):287-300.

〔学会発表〕(計5件)

C.K. Lim, M.L. Moi, A. Kotaki, M. Saijo, I. Kurane, T. Takasaki. Molecular diagnosis and analysis of imported chikungunya virus strains, Japan, 2006-2011. The 9th Japan-China International Conference of Virology. Sapporo, Japan. June 12-13, 2012.

Lim CK, Ami Y, Fujii Y, Moi ML, Kitaura K, Shirai K, Takayama-Ito M, Nakayama E, Kotaki A, Morikawa S, Saijo M, Suzuki R, Kurane I, Takasaki T. Pathogenesis of chikungunya virus in the common marmoset (*Callithrix jacchus*). The Symposium of Thirty years of Bluetongue Virus Research Achievements, Oxford, England, September 2013.

Lim CK, Takasaki T, Moi ML, Nakayama E, Kotaki A, Chua KB, Saijo M, Kurane I. Molecular analysis of Chikungunya virus in Malaysia. The chikungunya 2013 meeting, Langkawi, Malaysia, October 2013.

Moi ML, Lim CK, Nakayama E, Tajima S, Kotaki A, Ikeda M, Saijo M, Kurane I, Takasaki T. Imported cases of chikungunya and Ross River fever in Japan. The chikungunya 2013 meeting, Langkawi, Malaysia, October 2013.

中山絵里, 小滝徹, 谷ヶ崎和美, 林昌宏, 西條政幸, 高崎智彦. チクングニア熱の輸入症例の報告および血清学的診断法の開発. 第62回日本ウイルス学会学術集会. 神奈川. 2014.

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計0件)

名称:

発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者 高崎 智彦  
(TAKASAKI Tomohiko)  
国立感染症研究所、ウイルス第一部、室長  
研究者番号：20221351

(2) 研究分担者 松谷 隆二  
(MATSUTANI Ryuji)  
独立行政法人国立病院機構相模原病院、臨床研究センター、研究員  
研究者番号：70372290

(3) 研究分担者 鈴木 隆二  
(SUZUKI Ryuji) 独立行政法人国立病院機構  
相模原病院、臨床研究センター、室長  
研究者番号：70373470

(4) 研究協力者 中山 絵里  
(Eri Nakayama)  
国立感染症研究所、ウイルス第一部、研究員  
研究者番号：40645339

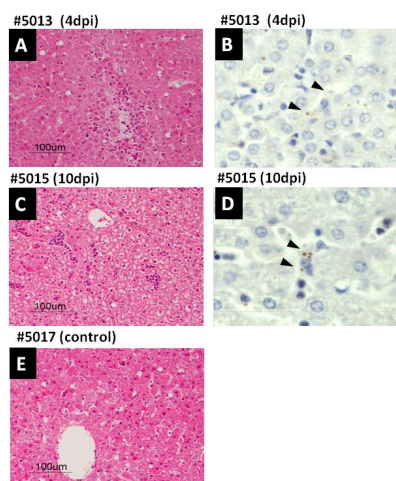


図 2 病理写真