

デングウイルス感染霊長類 モデルの開発

高崎智彦

国立感染症研究所ウイルス第一部

はじめに

2014年8月、日本国内では約70年ぶりとなるデング熱の国内感染症例が確認され、東京の代々木公園で感染蚊に刺されたと考えられるデング熱患者を中心に162症例が報告された。デング熱・出血熱は、デングウイルスの感染によって引き起こされる。近年のデング熱流行域は熱帯や亜熱帯地域であるが、その急速な拡大の背景には、媒介蚊の生息地の拡大とともに都市化に伴う人口密度の増加および国際的な渡航者数、渡航頻度の増加による新たなウイルスの持ち込みにより、2～3年に1回程度の大流行であった流行地においても毎年のようにそれなりに大きな規模の流行を繰り返している。世界人口の1/3が流行地域で生活しているにもかかわらず、デングウイルスに対する実用化されたワクチン、抗ウイルス剤が存在しないのが現状である。ワクチン、抗ウイルス剤の開発および実用化に欠かせないのが、それらの有効性と安全性を評価する感染動物モデルである。

1. デング熱国内流行の歴史

デング熱は、そのカタカナ名から比較的新しい病気のように思われているが、その歴史は意外に古く、デング熱らしき流行は18世紀ころにすでに報告があるともいわれている。東アジアでの確かな流行としては、1872年8月廈門（アモイ）での流行が台湾医学会雑誌1: 31–35（1902）に雑録の形で記載されている。1942–1945年の流行以前に我が国においても大正時代にすでに研究されていた感染症である。昭和初期には台湾や沖縄で流行があり、その症例報告（和文）もされていた。海外でも当然デング熱の研究は行われていたが、日本でも盛んに研究されていた。大正時代の研究では、患者の血液をさまざまな動物に接種して同様の症状が発生しないかといった研究がなされていた。このような熱心な研究を背景に、

上述のように太平洋戦争中に西日本（長崎・佐世保、福岡、広島・呉、神戸・大阪）を中心とした患者数約20万人規模のデング熱の国内流行が発生した。その流行時に、堀田進博士らが1943年に長崎でデング熱患者からデングウイルス1型を分離した。その分離方法はデング熱患者の血液を乳のみマウスの脳内に接種する方法であった。成長したマウスの腹腔や皮下に接種してもデングウイルス感染は成立しないが、乳のみマウスに脳内接種することでデングウイルスを脳内で増殖させることは可能である。乳のみマウスの免疫機構は未熟であり、決して動物モデルたりえない。つまるところ、後述するがデングウイルスに対して感受性のある動物は、インターフェロンノックアウトマウスやヒトIL-2R γ などを発現させた特殊なマウスを除き霊長類のみである。

2. デング熱動物モデル開発の歴史

我が国でも戦前には台湾や沖縄で流行があり、患者の血液をさまざまな動物に接種して同様の症状が発生しないかといった研究がなされていた。マウス、ラット、モルモット、ウサギ、イヌ、ヤギなどの哺乳類をはじめハトやトカゲにいたるまで試されたがいずれも明確な症状を呈することはなかった。近年、デングウイルス遺伝子検出（PCR法）が可能になってからもマウス、ラット、モルモット、イヌ、スナネズミなども試されたがウイルス血症を確認することはなかった。結局、デング熱動物モデルの開発は、遺伝子改変マウスの開発か霊長類モデルの確立に向かう流れとなった。遺伝子改変マウスは、デングウイルス感染による病態解析には有用であるが、ワクチンや抗ウイルス剤の評価にはその後の臨床試験を考えるとやはり遺伝子改変のない自然な動物モデルが必要であるという点から、我々は霊長類モデル確立にこだわった。

アカゲザル（rhesus macaque）やカニクイザル（cynomolgus macaque）などの旧世界ザルは、デング



ウイルス感染は成立するが発病することはなく、ウイルス血症も1~2日程度と短期間で低い。したがって、ワクチンや抗ウイルス剤の評価モデルとしては理想的であるとはいえない。我々は、黄熱の流行地でもある南米に生息する新世界ザルであるマーモセット (*Callithrix jacchus*) に着目しデングウイルスを感染させた。デングウイルス感染霊長類モデルとしてマーモセットを見出したのは、最初の感染実験で血尿をきたした個体が確認されたことであった。ウイルス接種後4日目の出来事で肉眼的血尿が確認されたため、 -80°C で冷凍保存されていた血清を直ちにリアルタイム RT-PCR 法によりウイルス力価を確認した。その結果、アカゲザルやカニクイザルと比べてはるかに高いウイルス血症が確認され、接種後2~7日目以上持続した。また、尿からもウイルス遺伝子が検出された。血尿をきたしたマーモセットの病理解剖の結果、腎臓に肉眼的退色を認めた。その後の感染実験でも個体によっては血尿をきたす場合が確認された。腎症状はヒトのデング熱ではそれ程みられる症状ではないが、ヒトの尿中からウイルス遺伝子を検出できる症例もあり、デングウイルス感染マーモセットの尿中からもウイルス遺伝子が検出できたことから、ヒトのデング熱症例においても何らかの軽微な腎病変が存在することが示唆される。最近、我々はマーモセットに発疹 (petechia) を来す臨床分離株を見出した。発疹部位の病理組織検査で、出血性の発疹であることが確認された。

マーモセットは体重が300グラム程度と旧世界ザルと比べて小さく扱いやすいという利点がある。また、遺伝子改変マウスと異なり、自然な動物モデルであり、ワクチンや抗ウイルス剤の評価動物モデルとして現状では最も理想的といえる。新世界ザルであるマーモセットの弱点としては、その免疫学的背景が旧世界ザルと比較して不明な部分が多かった。そこで我々の研究グループは、リアルタイム PCR によるサイトカイン等の発現解析系、コモンマーモセット MHC 解析系、コモンマーモセット TCR レパトア解析系、個体識別系を確立した。具体的な項目としては、CD3 ϵ , CD4, CD8 α , IL-2, IFN- γ , TNF- α , IL-4, IL-5, IL-10 などが測定可能である。また、抗体検査に関しては霊長類であるマーモセットの血清 IgM 抗体、IgG 抗体はヒトのものと交差性を有し、若干感度は低下するがヒト用の ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) キットで測定することが可能である。

3. ワクチン開発の現状

デングウイルスは、フラビウイルス科フラビウイルス属のウイルスで、日本脳炎ウイルス、黄熱ウイルスなどと近縁のウイルスである。フラビウイルス属のウイルスに関してワクチンが実用化されているのは、日本脳炎ワクチン (不活化、弱毒生ワクチン)、黄熱ワクチン (弱毒生ワクチン)、ダニ媒介性脳炎ウイルス (不活化ワクチン) である。そして現在開発中であるのが、ウエストナイルワクチン (ウマ用不活化ワクチンは実用化されている) とデングワクチンである。

デングワクチンの開発と実用化への現状は、臨床試験段階の候補ワクチンがある。有力な二つを挙げると、黄熱生ワクチン 17D 株をベースに開発されたキメラワクチン CYD-TDV は、弱毒黄熱ワクチン 17D 株を骨格に、DENV1~4 型のウイルス粒子表面蛋白である前駆膜/エンベロープ (prM/E) 遺伝子と置換して作製した4種のキメラウイルスから構成されるカクテルワクチンである。第3相臨床試験はアジア・中南米の10か国で実施され、一応その効果 (アジア 56.5%, 中南米 60.8%) と安全性は確認されている。次に実用化にむけて臨床試験が進んでいるワクチンは、弱毒 DENV-2 の 16681/PDK-53 株、そして DENV-2 以外はそれを骨格として各血清型の prM/E 遺伝子と置換したキメラウイルスから成るワクチン (DENVax) である。

デング候補ワクチンの有効性の評価の難しさは、4つの血清型が存在することによる。例えば日本脳炎ウイルスは単一血清型のウイルスであり、中和抗体価が10倍以上あれば防御効果があるとされている。これは、マウスに受動免疫を付与する実験から、中和抗体10倍を指標に日本脳炎ワクチン政策を実施してきた結果、年間の患者発生数を10人以下に抑えられているわが国の現状による。デングワクチンに関しても中和抗体10倍は一つの指標であったが、デングウイルスの場合は血清型が異なるヘテロの抗体による中和抗体の底上げを考慮する必要がある。ホモの中和抗体とヘテロの中和抗体の間で防御効果に差があるかどうかの詳細なデータはまだないが、全く同じではないことは想定される。今後の課題であるが、マーモセットを用いた受動免疫実験により、交差中和抗体による感染防御能を検証したいと考えている。

おわりに

デング熱流行は、熱帯・亜熱帯地域で終息する可能性は低く、日本からの海外渡航者および日本への海外からの旅行者が減る要素もない。したがって、ヒトスジシマカが活発に活動する夏季には、国内デング熱流行のリスクは存在する。現状でできることはヒトスジシマカの数減らし、輸入デング熱患者に有熱中は戸外にでないようしてもらうなどの対策しかない。しかし、こういった媒介蚊対策にも限界があることを考えるとワクチンあるいは抗デングウイルス薬の実用化が急務である。マーマセツトがその実用化に寄与できると確信している。

謝 辞

デングウイルス感染霊長類モデルの開発研究は、以下の多くの共同研究者の協力により遂行され、今後も継続する予定である。

モイ メンリン、大松 勉、田島茂、伊藤美佳子、小滝 徹、池田真紀子、網 康至、須崎百合子、倉根一郎（国立感染症研究所）、明里宏文（京都大学霊長類研究所）、片貝祐子（医薬基盤研究所）、中村 紳一朗（滋賀県立医科大学）、白井賢治、北浦一孝、松谷隆治、鈴木隆二（国立相模原病院）。

（註）現在、所属が変わっている先生もいます。