




学位論文審査の結果の要旨

審査区分 課・論	第545号	氏名	ルッキー ロナルド ルトウウエネ
審査委員会委員	主査氏名	山岡 吉生	
	副査氏名	菅名 良久	
	副査氏名	平松 和史	
論文題目 Dengue transmission model by means of viremic adult immuno-competent mouse (ウイルス血症の免疫正常マウスを用いたデングウイルス媒介モデル)			
論文掲載雑誌名 Parasites & Vectors			
論文要旨 デングウイルス感染により、人体では3種の疾患、すなわちデング熱、デング出血熱、およびデングショック症候群、を引き起こすことがある。デングショック症候群患者は、死にいたることもある重篤な疾患であるが、未だ有効なワクチンはなく、最重要なのは感染予防である。感染予防研究には動物実験が重要となるが、宿主はヒトおよび霊長類のみであり、今まで有効な動物モデルが存在しなかった。小動物を使えることが理想であるが、通常免疫正常マウスでは感染・伝播に必要な量のウイルス血症には至らず、高価な一部の遺伝子変異マウスのみでウイルス血症が認められるのが現状であった。そこで本研究では、免疫正常マウスでも充分量のウイルス血症を得て、蚊に多量のデングウイルスを媒介させる画期的な方法を模索することを目的とした。 先行研究にて、ヒトの細胞株にデングウイルスと型の異なる血清型のデングウイルスに対する抗体を共培養させると、デングウイルスの増殖が飛躍的に増加するという研究があったため、その理論を応用することとした。具体的には、K562細胞に、デングウイルス2型およびデングウイルス4型に対する抗体を2時間共培養し、遠心して上清を除いた後に、抗デングウイルス4型抗体を加えた状態で、2日間培養し、遠心して上清を除いたペレットをC3Hマウスに腹腔内投与した。5時間後、ネッタイシマカ ( <i>Aedes aegypti</i> Liverpool: 1NB12株) に1時間吸血させ、その後2, 6, 12, 24時間後に蚊を採取して冷凍保存した。マウスおよび蚊のウイルス量は、プラークアッセイ (Plaque assay) で確認し、蚊内のウイルスについては、RT-PCRでも確認した。 結果として、マウス内のウイルス量は7時間までの観察で $10^5$ PFU/mL以上を保っていた。さらに蚊内のウイルス量も24時間では $10^2$ PFU/mL以下に減少したものの、12時間までは約 $10^4$ PFU/mLを保っていた。 以上、今まで困難とされていた免疫正常マウスでの充分量のウイルス血症 ( $10^4$ PFU/mL以上は必要と考えられていた) を達成し、さらに多量の蚊にウイルスを伝播されることにも成功した。本方法は、安価で比較的簡便な方法であり、今後のデングウイルス感染症研究において、重要な研究手段となることが期待される。  このため、審査員の合議により本論文は学位論文に値するものと判断した。			

最終試験  
の結果の要旨  
~~学力の確認~~

審査区分 ①・論	第545号	氏名	ルッキー ロナルド ルトゥウエネ
審査委員会委員		主査氏名	山岡 吉生 
		副査氏名	鈴木 英人 
		副査氏名	平松 和史 
<p>学位申請者は本論文の公开发表を行い、各審査委員から研究の目的、方法、結果、考察について以下の質問を受けた。</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. 自然界で、ヒトに感染した場合には、どの程度の血中ウイルス濃度であるか？例えば、昨年の代々木公園での感染では、どの程度の濃度であったのか？</li> <li>2. 自然界のデングウイルス陽性蚊では、どのくらいの期間感染しているのか？</li> <li>3. デングウイルス (DENV) は蚊の体内のどの部位、どの細胞で増えるのか？</li> <li>4. 方法論的には、過去のYamaoka &amp; Konishiらの研究 (ウイルスと抗ウイルス抗体の共培養) が基本になっているが、特に本研究で新規と言える点はどこにあるのか？</li> <li>5. なぜ、K562細胞を用いたのか？他の細胞との差異はあるのか？</li> <li>6. K562細胞は、ヒト由来の細胞であるが、その後にマウスに感染させるのに、なぜマウスの細胞を用いなかったのか？ヒト細胞を用いることで、マウスに拒絶反応などは起こらないのか？</li> <li>7. なぜ、C3Hマウスを用いたのか？このマウスを用いることに何かのメリットがあったのか？</li> <li>8. D4-I-1D6というモノクローナル抗体はデングウイルスの何蛋白に対する抗体か？</li> <li>9. 腹腔内に移植された感染K562細胞はどうなったのか？</li> <li>10. デングウイルスを感染させたK562細胞をマウスに接種しているが、結局どの程度のウイルス量をマウスに接種したことになるのか？</li> <li>11. ウイルス感染症と宿主のNK活性との関係はどのようにになっているのか？</li> <li>12. 感染させた蚊は24時間までウイルスが検出されているが、24時間以降の蚊からのウイルス検出は検討したのか？</li> <li>13. デングウイルス感染マウスのウイルス血症は何時間まで持続するのか？その検討は行ったのか？</li> </ol> <p>これらの質疑に対して、申請者は概ね適切に回答した。よって審査委員の合議の結果、申請者は学位取得有資格者と認定した。</p>			

(注) 不要の文字は2本線で抹消すること。

## 学 位 論 文 要 旨

氏名 Lucky Ronald Runtuwene

## 論 文 題 目

Dengue transmission model by means of viremic adult immuno-competent mouse(ウイルス血症の免疫正常マウスを用いたデングウイルス媒介モデル)

## 要 旨

## 緒 言

Dengue virus infection manifests in three distinct forms in humans: dengue fever, dengue hemorrhagic fever, and dengue shock syndrome. Infection with the virus is a fatal disease; no vaccine is available and prevention depends on interruption of the chain of transmission. The study of dengue viral transmission by mosquitoes is hindered due to the lack of an affordable animal model. In general, immuno-competent mice are used as a simple and inexpensive animal model, but mice are not susceptible to dengue virus infection and therefore viremia will not occur following the inoculation of the virus in such mice. Here, we report a method for creating artificial viremia in immuno-competent mice, and further demonstrate the use of viremic mice to simultaneously infect a large number of *Aedes aegypti*.

## 研究対象及び方法 (材料を含む)

We infected K562 cells with DENV-2 in the presence of an antibody against DENV-4. We then incubated the cells for 2 d before injecting the infected cells into C3H mice. After 5 h incubation, we allowed 100–150 female *Aedes aegypti* to feed on blood from the mice directly. We collected blood samples from the mice and from randomly selected *Ae. aegypti* at 2, 6, 12, and 24 h post-blood meal and screened the samples for DENV-2 genome as well as for virus concentration.

## 結 果

Our procedure provided high virus concentrations in the mice for at least 7 h after viral inoculation. We found that 13 out of 14 randomly picked mosquitoes were infected with DENV-2. High concentrations of virus were detected in the mosquitoes until at least 12 h post-infection.

## 考 察

Using the viremic immuno-competent mouse, we show that mass infection of *Ae. aegypti* is achievable. Compared to other infection techniques using direct inoculation, membrane-feeding, or immuno-deficient/humanized mice, we are confident that this method will provide a simpler and more efficient infection technique.