博士（獣医学）　姚　　建　勝

学 位 論 文 題 名

Studies on enhancement and neutralization of hantavirus infection with antibodies in macrophage cell lines

（マクロファージ株化細胞におけるハンタウイルスの抗体依存性感染増強と中和に関する研究）

学位論文内容の要旨

腎症候性出血熱（Hemorrhagic fever with renal syndrome : HFRS）は主にげっ歯類から人が罹患し，高熱，出血傾向及び腎臓障害を起こす極めて重篤なウイルス性人獣共通伝染病である。本病の病原ウイルスはブニヤウイルス科のハンタウイルス属に属し，現在，由来動物種に対応した4種類の血清型（*Apodemus*, *Rattus*, *Clethrionomys*, *Microtus*）がある。

これまでドブネズミにおけるハンタウイルスの感染調査では，中和抗体価の高い成熟個体からのウイルス分離率が著しく高く，中和抗体存在下での本ウイルスの持続感染の機序を巡って大きな関心が寄せられていた。最近，本ウイルスに対してマクロファージや単球の感受性が高く，標的細胞の一つとして全身的な感染の拡大に大きな役割を果すばかりでなく，抗体の存在下ではむしろ感染を増強することも報告された。これと同様のマクロファージにおける抗体依存性感染増強（antibody−dependent enhancement of infection : ADE）現象はデング熱でも認められ，デング出血熱やデングショック症候群にみられる病勢増悪の主因の一つと考えられている。従って，ハンタウイルス感染における ADE の発現は抗体産生にもとずく HFRS の重症化の可能性を示唆するもので，抗血清投与やワクチン接種による感染あるいは発症予防を図る上の大きな障害と考えられ，ADE の発現機序と中和抗体の役割について早急な検討が待たれていた。

本論文は2章から構成され，第1章ではマクロファージ株化細胞を用いて，抗体によるハンタウイルスの ADE 発現のための条件を検討するとともに ADE に関与する抗原決定基の同定を行った。第2章では中和単クロン抗体とそれから調整された Fab 断片を用い，マクロファージ株化細胞へのハンタウイルスの感染と中和の機序を検討した。これらの成績は以下のごとくである。

1．抗体によるハンタウイルスの感染増強：ハンタウイルスを抗体と反応させてからマクロ

ファージ株化細胞に接種し，培養4日後の感染細胞と培養上清の感染価をもとに，ADE発現と抗体濃度との関係を検討した。マクロファージ細胞にはマウス由来のJ774.1とP388D1およびヒト由来のU937を使用した。感染細胞と培養上清の感染価の測定は単層Vero－E6細胞でのinfectious center assay（ICA）とperoxidase antiperoxidase（PAP）法を用いて行った。中和抗体価は80％フォーカス減少法により測定した。

まず，マウス由来のJ774.1細胞に*Apodemus*型のHantaan76－118あるいは*Rattus*型のSR－11株をmultiplicity of infection（m.o.i.）約0.05で接種し，培養4日目に感染細胞の割合をICAとindirect immunofluorescence antibody（IFA）法で測定した。感染率はHantaan76－118株では0.08％（80／10^5cells），SR－11では0.03％（28／10^5cells）であったが，培養上清のウイルス感染価は両株とも検出限界以下（<20FFU／㎖）であった。しかし，免疫血清を100倍及至10,000倍に希釈してウイルスと反応させてから細胞に接種したところ，感染細胞数と上清の感染価はいずれの株でも著しく上昇した（Hantaan76－118：318／10^5cells，1780FFU／㎖，SR－11：660／10^5cells，760FFU／㎖）。このような免疫血清存在下でのADE現象はヘテロウイルスの場合よりホモウイルスの方がより低い血清濃度域で発現することが観察された。また，Hantaan76－118株を免疫血清と反応させてからP388D1細胞とU937細胞に接種したところ，いずれの細胞でも顕著なADEが認められた。次に単クローン性抗体を用いて検討したところ，本ウイルスのもつ2種類の膜糖タンパクG1とG2に対する抗体はすべてADEを示したが核タンパクに対する抗体では全く認められなかった。さらに膜糖タンパクに対する各種単クローン性抗体のうちADE能をもつものはすべて中和活性あるいは血球凝集抑制活性（HAI）のいずれかを保有した。しかし，ADE能を持たない抗体はいずれの活性をも示さなかった。すなわち，膜糖タンパクの中和あるいはHAIに関与する抗原決定基はマクロファージでのADEにも関与していることが明らかになった。さらに中和単クローン性抗体と中和能のないHAI単クローン性抗体を比較したところ，前者の中和活性は高濃度でのみ認められたものの希釈とともに減弱し，逆にADE作用が発現した。これに対して，後者では高濃度の抗体でも中和は認められず，ADEのみ発現した。すなわち，マクロファージに対するハンタウイルス感染は高濃度の中和抗体の存在によってはじめて阻止されることが判明した。

2．ADEと中和の機序の検討：マクロファージにおけるハンタウイルスのADEと中和反応の機序をさらに詳しく検討するために，膜糖タンパク上の中和に関与する3種類の抗原決定基（G1b，G2a，G2c）に対する単クローン性抗体およびそれぞれの抗体から調製されたFab断片を用いてP388D1細胞に対するHantaan76－118株の感染実験を行った。使用された中和

単クローン性抗体はすべて高濃度でのみマクロファージの感染を中和した。また，G 1 タンパクに対する抗体は，G 2 タンパクに対するものよりやや強い中和活性を示すとともに，より低濃度でも ADE 作用を示した。しかし，中和単クローン性抗体の Fab 断片では中和あるいは ADE のいずれも認められなかった。そこで中和抗体の Fab とウイルスとの複合体に抗 Fab 抗体を反応させたところ，高濃度の Fab 断片では中和を示したが，Fab 濃度の減少とともに感染価が上昇して最高値に達した後次第に減少した。これに対して，非中和単クロン抗体の Fab 断片では抗 Fab 抗体を加えても中和は全く認められず ADE のみが発現した。このようにマクロファージでの中和はウイルスと結合した 2 価の中和抗体の濃度に依存して発現し，単価の Fab では全く認められなかった。

そこで次にハンタウイルスを中和能を持たない抗体を介してマクロファージに吸着させた後に中和抗体を作用させ，吸着後のウイルスに対する中和抗体の効果を検討した。まず，Hantaan76－118株を非中和単クローン性抗体と反応させてから 4 ℃で P 388D 1 細胞に接種し，抗体の Fc 部分と P 388D 1 細胞の Fc レセプターと結合させることによって，ウイルスを細胞に吸着させた。続いてこれに中和単クローン性抗体を加えて 4 ℃で反応させてから良く洗浄し，37℃で16－18時間培養した後，感染細胞数を測定して，細胞吸着ウイルスに対する中和抗体の効果を検討した。すなわち，マクロファージに直接ウイルスを接種した場合，ウイルスの吸着効率は著しく低く，細胞感染率は0.08％（8／10^4cells）であった。一方，ウイルスに非中和抗体を添加してから細胞に接種すると細胞感染率は0.8％（80／10^4cells）に増加した。しかし，これらの細胞吸着ウイルスに中和単クローン性抗体を反応させると，感染細胞の割合は再び減少した。また，ここでもG 1 タンパクに対する中和抗体の中和活性はG 2 タンパクに対するものより明らかに高かった。

以上のごとく，マクロファージにおけるハンタウイルスの ADE 現象はウイルスと結合した抗体の Fc 部分とマクロファージの Fc レセプターとの結合によって細胞へのウイルス吸着が容易になった結果と判断された。しかもその ADE に関与する抗体はハンタウイルスの膜糖タンパクに対する抗体のうち中和活性あるいは HAI 活性を有するものに限られ，抗核タンパク抗体では全く認められなかった。また，中和抗体はマクロファージにおけるハンタウイルスの感染に対して高濃度では中和を，低濃度では感染増強を示し，1 種類の抗体が濃度に依存した 2 つの相反する作用を有することが証明された。これらの知見はハンタウイルスの免疫，持続感染や発病機序などを検討する上の基礎資料となるばかりでなく，HFRS ワクチンを開発する上にも極めて重要な意義を持つと思われる。

学位論文審査の要旨

主　査　　教　授　　橋　本　信　夫
副　査　　教　授　　板　倉　智　敏
副　査　　教　授　　小沼　　操
副　査　　助教授　　高　島　郁　夫

腎症候性出血熱（Hemorrhagic fever with renal syndrome : HFRS）は主にげっ歯類から人が罹患し，高熱，出血傾向及び腎臓障害を起こす極めて重篤なウイルス性人獣共通伝染病である。本病の病原ウイルスはブニヤウイルス科のハンタウイルス属に属し，由来動物種に対応した4種類の血清型がある。これまで，ドブネズミにおける本ウイルスの感染調査では中和抗体価の高い成熟個体からのウイルス分離率が高く，抗体存在下での持続感染の機序を巡って大きな関心が寄せられていた。そこで著者は培養マクロファージを用い，抗体存在下でのハンタウイルスの感染と中和の機序について検討を行った。本論文はこれらの成績をまとめたもので英文62頁からなり，参考論文4編を付している。

1．抗体によるハンタウイルスの感染増強：供試ハンタウイルスとして *Apodemus* 型 Hantaan 76－118株と *Rattus* 型 SR－11株を使用した。マクロファージ細胞にはマウス由来のJ774.1とP388D 1およびヒト由来のU937を使用した。また，感染細胞と培養上清の感染価の測定は単層Vero－E 6細胞での infectious center assay（ICA）と peroxidase antiperoxidase（PAP）法を用いて行った。中和抗体価は80％フォーカス減少法により測定した。

マウス由来のJ774.1細胞にウイルスを感染の多重度約0.05で接種し，培養4日目に感染細胞数をICAとindirect immunofluorescence antibody（IFA）法で，また培養上清の感染価をPAP法で測定した。細胞の感染率はHantaan76－118株では0.08％，SR－11株では0.03％であったが，培養上清のウイルス感染価は両株とも検出限界以下（＜20FFU／㎖）であった。しかし，免疫血清を10,000倍希釈してウイルスと反応させてから細胞に接種したところ，感染細胞数と上清の感染価はいずれの株でも10－100倍上昇し，抗体依存性感染増強（antibody dependent enhancement : ADE）現象の発現が観察された。また，抗血清を添加して感染価を測定した場合，抗血清とホモウイルスの組合せではヘテロウイルスに比べて，より高希釈域で感染増強を示し，ADE現象にも特異性と交差反応性のあることが判明した。そこで本ウイルスの2種類の膜糖タンパク，G1とG2に対する単クローン性抗体を用いたところ，ADE能をもつ

ものはすべて血球凝集抑制活性（HAI）を示したが，中和活性はそれらの一部でしか認められなかった。しかし，ADE 能のない抗体は HAI と中和のいずれの活性も示さなかった。また，中和単クローン性抗体の中和活性は高濃度でのみ認められ。低濃度では逆に ADE 作用が発現した。これに対して，HAI 活性のみをもつ抗体では高濃度でも中和が認められず，ADE のみが発現した。さらに核タンパクに対する単クローン性抗体では ADE は全く認められなかった。

2．ADE と中和の機序の検討：マクロファージにおけるハンタウイルスの ADE と中和反応の機序をさらに詳しく検討するために，膜糖タンパクに対する単クローン性抗体ならびにそれらの抗体から調製された Fab 断片を用いて，P388D 1 細胞に対する Hantaan76－118株の感染実験を行った。使用された中和単クローン性抗体はすべて高濃度でのみマクロファージの感染を中和した。しかし，Fab 断片のみでは中和あるいは ADE のいずれの活性も認められなかった。そこで中和抗体の Fab とウイルスとの結合物に抗 Fab 抗体を反応させたところ，高濃度の Fab 断片ではウイルスの中和が認められたが，Fab 濃度の減少とともに感染価が次第に上昇し，顕著な ADE が発現した。これに対して，非中和単クローン性抗体の Fab 断片では抗 Fab 抗体を加えても中和は全く認められず ADE のみが発現した。このようにマクロファージでの中和はウイルスと結合した 2 価の中和抗体の濃度に依存して発現し，単価の Fab では全く認められなかった。

次にハンタウイルスを非中和抗体を介して低温でマクロファージに吸着させてから中和抗体を作用させ，吸着後のウイルスに対する中和抗体の効果を検討した。すなわち，マクロファージにウイルスを直接接種した場合，ウイルスの吸着効率は著しく低いが，ウイルスに非中和抗体に結合させてから細胞に接種すると感染率は約10倍上昇した。しかし，これらの細胞吸着ウイルスに中和単クローン性抗体を反応させると，感染細胞の割合は再び減少し，細胞内でのウイルス感染過程の阻害が確認された。

以上のごとく，本研究によって，マクロファージにおけるハンタウイルスの ADE 現象はウイルスと結合した抗体の Fc 部分とマクロファージの Fc レセプターとの結合によって細胞へのウイルス吸着が容易になった結果と判断された。しかもその ADE に関与する抗体はハンタウイルスの膜糖タンパクに対する抗体のうち中和活性あるいは HAI 活性を有するものに限られ，抗核タンパク抗体では全く認められなかった。また，中和抗体はマクロファージにおけるハンタウイルスの感染に対して高濃度では中和を，低濃度では感染増強を示し，1 種類の抗体が濃度に依存した 2 つの相反する作用を現わすことが証明された。これらの知見はハンタウイルスの持続感染と中和反応の機序を解明する上で貢献するところが大きい。よって審査員一同は姚建勝氏が博士（獣医学）の学位を受ける資格を有するものと認める。