

学 位 論 文 題 名

Epizootiological Studies of Hantavirus Infection
among Wild Rodents in Hokkaido Using New
Laboratory Techniques

（北海道の野ネズミにおけるハンタウイルス感染の新診断法による疫学的研究）

学位論文内容の要旨

腎症候性出血熱 (Hemorrhagic fever with renal syndrome: HFRS)はハンタウイルスの感染によって起こる重篤な人畜共通伝染病である。自然界においてハンタウイルスは各種の小型哺乳類を病原巣として世界各地に広く分布しているが、本ウイルスの血清型や人に対する病原性が自然宿主の種類によって相違するために、人における本病の発生も宿主動物の種類、密度や棲息状況ならびに感染動物との接触機会などと深く関連している。しかし、本ウイルスは培養細胞でのウイルス分離や感染価測定が難しく、また、その取り扱いに高度安全施設を必要とするために、実験室内検査法やワクチンの開発・研究が著しく立ち遅れていた。

本論文の第I部では多種類の動物におけるハンタウイルス感染を調査するために、3種類の実験室内検査法を開発し、これらの実用性を検討した。さらに第II部ではこれらの検査法を応用し、北海道の野生

げっ歯類についてハンタウイルス感染の有無を調査するとともに自然界におけるハンタウイルスの存続について生態学的な考察を加えた。

第I部 ハンタウイルス感染の実験室内診断法の開発

1. プロテインGと酵素抗体法を組み合わせたハンタウイルス抗体測定法 (Protein G antibody assay:PGA) の開発

一般に免疫診断法は抗体測定之感度と精度に優れるが、動物種毎に免疫グロブリンの特異性が異なるため、多種類の動物血清について同一試薬と同一術式で抗体測定を行うことが困難であった。そこで動物種を問わずIgG抗体と特異的に結合するプロテインGの特性を応用し、多種類の動物のハンタウイルス抗体の簡便・迅速な検出法としてPGAを開発した。まず、マルチウェルスライドに単層培養されたハンタウイルス感染細胞を冷アセトンで固定して、血清を反応させた。これを洗浄後ビオチン化プロテインGを加えてIgG抗体と結合させ、さらにAvidin-biotin complexで反応を増幅してジアミノベンチジンで発色させた。このスライドを光学顕微鏡下で観察し、ハンタウイルス特有の細胞質内顆粒の有無を基準に判定した。供試されたラット、マウス、スナネズミ、エゾヤチネズミ、アカネズミと家兎の陽性血清のPGAによる抗体価は従来の間接蛍光抗体法や中和試験の成績と良く一致した。すなわち、PGAは異なった動物種の抗体を同一試薬を用いて一挙に測定でき、多種類の動物を対象にした感染症の血清疫学的調査が可能となった。

2. 遠心力による培養細胞でのハンタウイルスの感染増強（遠心 - 細胞接種法）

ヘルペスウイルスなどでは接種された培養細胞を低速遠心することにより感染の増強することが報告されている。そこで、培養細胞でのハンタウイルスの感染効率を高めるために遠心力の効果を検討した。すなわち、単層培養Vero E6細胞をウイルス接種と同時に671 x g、2時間遠心したところ、ハンタウイルスの感染価が3～21倍上昇した。この感染増強は0.22 μ mのフィルターで濾過されたウイルスでも発現するので、単なるウイルス凝集塊の付着によるものではない。しかし、この現象は細胞へのウイルスの接種と遠心を同時に行った場合にのみ発現し、接種前あるいは後に遠心をしていても効果は認められなかった。従って、遠心により加重した重力が感染初期のおそらく細胞へのウイルスの吸着・侵入を促進したものと判断された。

3. Nested reverse transcriptase polymerase chain reaction (nested RT-PCR)による感染動物からのハンタウイルスゲノム検出法

ハンタウイルスは培養細胞での増殖速度が遅く、感染価の定量が難しいために*in vivo*における感染、増殖や病原性に関する研究が著しく遅れていた。そこで感染価測定法に代わる簡便なウイルス検出法として、nested RT-PCR法の開発を行った。

ハンタウイルスはヌクレオキャプシド蛋白、膜タンパクとRNAポリメラーゼならびにそれらをコードするS, M, Lの3本のRNAセグメントから構成されている。ここではヌクレオキャプシド蛋白をコー

ドするSゲノムを検出するプライマーセットを用い、nested RT-PCRにより感染動物からのハンタウイルスの検出法を検討した。感染マウス臓器におけるSゲノムの検出感度は従来のウイルス分離法や抗原検索法よりもはるかに高く、感染動物からのウイルス検出法としての高い実用性が認められた。

第II部 北海道の野生げっ歯類におけるハンタウイルスの感染調査

第I部で開発した3種類のハンタウイルス検査法を用い、北海道の野ネズミ類におけるハンタウイルスの感染調査を実施した。

4. 東アジアで分離されたSeoul型ハンタウイルスのMゲノムの遺伝学的解析

Seoul ウイルスは*Rattus*属ネズミを自然宿主とするハンタウイルスである。これまで北海道上磯町の一ドブネズミ集団において抗体陽性個体から1983、1985と1988年にそれぞれ1株ずつSeoul型ウイルスが分離された。これらの株は中和試験で抗原性を区別できなかった。

また、ウイルス中和に関与する膜蛋白をコードするMゲノムの塩基配列も株間で著しく高い相同性を示していた（M遺伝子3651塩基中10以下の塩基置換）。すなわち、本ウイルスはドブネズミ集団内で長年維持され、しかも中和抗体陽性例からウイルスが分離されたにもかかわらず、Mゲノムの塩基置換が少なく、高い保存性が認められた。そこで、中国、韓国と日本で分離されたSeoul型ウイルスのMゲノムの塩基配列を比較して系統樹解析を行ったところ、ウイルス分離地の地理的關係とM遺伝子の類縁關係の間に密接な関連が認められ、感

染動物の移動経路の追跡が可能となった。

5. 北海道の野ネズミ類におけるハンタウイルス感染の疫学調査

1980年以来北海道各地で捕獲された土着の野ネズミ類（エゾヤチネズミ、エゾアカネズミ、ヒメネズミ、ミカドネズミ）合計663匹についてハンタウイルスの抗体調査を行った。PGAによる抗体測定ではエゾヤチネズミでのみ陽性例が10.4%検出された。既知のハンタウイルスを用いた抗体陽性例の交差中和試験では、いずれの血清も北欧のヨーロッパヤチネズミ由来のPuumalaウイルスに最も強く反応した。また、抗体陽性例の肺材料からRT-PCRによりSゲノムを増幅したところ、9例中8例からハンタウイルスゲノムが検出された。さらに、本ゲノムの塩基配列と予想されるアミノ酸配列は既知のハンタウイルスの中でPuumalaウイルスと最も高い相同性を示し、北海道のエゾヤチネズミにPuumala型ウイルスの浸淫していることが推測された。しかし、抗体陽性ネズミの肺材料について遠心-細胞接種法を用いてウイルス分離を試みたが、すべて陰性であった。

以上のごとく、多種類の動物を対象にしたハンタウイルス感染症の簡便な実験室内診断法を確立し、北海道の野生げっ歯類におけるハンタウイルスの感染調査を行ったところ、一ドブネズミ集団からSeoul型ウイルスが、また、各地のエゾヤチネズミではPuumala型ウイルスの感染が証明され、さらにこれらのウイルスの移動や存続に関しても多くの生態学的知見が得られた。

学位論文審査の要旨

主 査	教 授	橋 本 信 夫
副 査	教 授	喜 田 宏
副 査	教 授	小 沼 操
副 査	助教授	高 島 郁 夫

学 位 論 文 題 名

Epizootiological Studies of Hantavirus Infection among Wild Rodents in Hokkaido Using New Laboratory Techniques

(北海道の野ネズミにおけるハンタウイルス感染の新診断法による疫学的研究)

ハンタウイルスはげっ歯類からヒトに感染する腎症候性出血熱の病原体である。本ウイルスは培養細胞による分離が困難なために、これまで疫学的研究は著しく遅れていた。本論文では、ハンタウイルス感染症の実験室内診断法を開発し、北海道の野ネズミにおける本ウイルスの浸淫状況について生態学的検討を行った。

1. プロテインG抗体測定法 (Protein G Antibody Assay; PGA): プロテインGと酵素抗体法を組み合わせ、同一試薬と同一術式により各種動物血清のハンタウイルス抗体を一斉に測定できる免疫診断法を開発した。これにより多種類の動物を病原巣とする感染症の血清疫学的調査が可能となった。

2. 遠心力による感染増強法: 培養細胞にハンタウイルスを接種し、低速遠心 (671 × g, 2時間) することにより感染価が通常の3~21倍上昇した。これは感染初期の細胞におけるウイルスの吸着・侵入が促進されたためと判断された。

3. Nested Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (Nested RT-PCR) によるウイルスゲノム検出法: ハンタウイルスの核蛋白をコードするSゲノムを検出するプライマーを用いてNested RT-PCRによるウイルス検出法を検討した。本法によるSゲノムの検出感度はウイルス分離法や抗原検出法より高く、著しい診断的価値が認められた。

4. Seoul型ハンタウイルスのMゲノムの解析: 北海道上磯町のードブネズミ集団から数年間隔で分離された3株のSeoul型ウイルス (KI株) について、膜蛋白をコードするMゲノムの塩基配列を比較したところ、これらの塩基置換率が著しく低く、高い保存性が認められた。また中国、韓国と日本で分離されたSeoul型ウイルスのMゲノムの系統樹解析では、分離地と塩基配列の間に密接な関連が認められ、感染動物の移動経路の追跡が可能となった。

5. 北海道の野ネズミにおける感染調査：PGAにより道内各地の野ネズミのハンタウイルス抗体を調査したところ、エゾヤチネズミでのみ全道的に約10%の抗体保有が認められた。さらに陽性血清の交差中和試験の成績ならびに陽性ネズミの肺材料からRT-PCRで増幅されたウイルスゲノムの解析から、エゾヤチネズミの保有するハンタウイルスは北欧の流行性腎症の病原体であるPuumalaウイルスに類似することが明らかとなった。

これらの知見はヒトにおけるハンタウイルス感染症の予防対策を確立する上で貢献するところが多い。よって審査員一同は荏和宏明氏が博士（獣医学）の学位を受ける資格を有するものと認めた。